
TRYPANOSOMA CRUZI:

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE BIODEMAS

NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Tiago Pires Bulhões,¹ Patrícia Lago Zauza,² Edmilson Domingos da Silva,² Marcello Xavier Sampaio³ e José Borges-Pereira¹

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o desempenho de diferentes técnicas e antígenos no diagnóstico sorológico da doença de Chagas em diferentes áreas endêmicas, foram produzidos três conjuntos diagnósticos (*kits*) para testes de imunofluorescência indireta (IFI) e três para imunoenensaio do tipo ELISA, empregando antígenos de *T. cruzi* dos biodemas I, II e III (cepas Y, 12-SF e Colombiana, respectivamente). Foram testados 541 soros com resultados para anticorpos anti-*T. cruzi* anteriormente conhecidos através dos testes comerciais de IFI e ELISA: 336 positivos e 205 negativos. O painel de soros, constituído por sorteio (tabela de números aleatórios), foi composto por 179 amostras de pacientes de Virgem da Lapa-MG, 176 de João Costa-PI e 186 do Sertão da Paraíba-PB. Todos os soros foram submetidos ao teste de IFI quantitativo nas diluições 1:40 até 1:2560, na razão 2, e ao teste de ELISA, na diluição de 1:100. A análise dos resultados dos testes de IFI mostrou eficiência de 100%, 99,8% e 97,6% para os biodemas I, II e III, respectivamente, enquanto nos testes de ELISA a eficiência para esses biodemas foi de 93,1%, 94,4% e 93,3%, respectivamente, sem diferença significativa em relação à área de origem dos soros.

DESCRITORES: Doença de Chagas. Sorodiagnóstico. Biodemas. Imunofluorescência indireta. Ensaio imunoenzimático (ELISA).

1 Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Departamento de Medicina Tropical, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

2 FIOCRUZ, Laboratório de Reativos Diagnósticos – Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ.

3 Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Departamento de Microbiologia e Parasitologia.

Endereço para correspondência: José Borges-Pereira, Avenida Brasil, 4.365, Manguinhos, Cx. Postal 926, CEP: 21045-900, Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Tropical. Tel: 2598-4339 R: 216, Rio de Janeiro-RJ.

Recebido para publicação em 13/8/2004. Revisto em 22/11/2004. Aceito em 25/11/2004.

INTRODUÇÃO

A pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em soros de pacientes com doença de Chagas teve seu início em 1913, com a introdução da técnica de fixação do complemento por Guerreiro & Machado (13), quatro anos depois de Carlos Chagas (8) anunciar a descoberta da nova tripanosomíase humana. No decorrer das nove décadas de conhecimentos acumulados sobre a endemia chagásica, foram incorporadas diversas técnicas de diagnóstico, como a precipitação em gel (18), aglutinação direta (15), imunofluorescência indireta (11), hemaglutinação indireta (7, 19), ensaio imunoenzimático (24), floculação rápida em lâmina (14), Western blot (22) e line immunoassay (17). Contudo, nem todas apresentam desempenho satisfatório, como é o caso das técnicas de diagnóstico parasitológico. O grau de excelência do diagnóstico da doença de Chagas tem sido alcançado pelos testes sorológicos, em especial, a imunofluorescência indireta (IFI), a hemaglutinação indireta e o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), os preferidos na prática atual. Essas técnicas, pelo elevado grau de confiança, têm sido aplicadas na avaliação do comportamento da infecção, na avaliação do impacto das medidas de controle vetorial em áreas endêmicas (20), no controle da transmissão transfusional, por excluir chagásicos candidatos à doação, e na avaliação da eficácia do tratamento específico da infecção chagásica (2, 10). Elas estão indicadas principalmente na fase crônica, em decorrência do desempenho pouco satisfatório das técnicas de diagnóstico parasitológico.

Protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, Honigberg (1963), família Trypanosomatidae, Doflein (1901), e subgênero *Schizotrypanum*, Chagas (1909), o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, não tem uma população homogênea. Vários estudos mostram diferenças significativas nas suas características biológicas, assinalando seu caráter heterogêneo. Em um estudo experimental com camundongos, Andrade (4) demonstrou variações significativas na virulência de cepas de *T. cruzi*, classificando-as em tipo I, de alta virulência, II, de média virulência, e III, de baixa virulência. Posteriormente essas cepas foram denominadas biodema I, representado pela cepa Y ou Peruana, biodema II, pela cepa 12-SF, e biodema III, pela cepa Colombiana. Estudos enzimáticos definiram a cepa Y com padrão de zimodema Z2b, a cepa 12 SF com padrão Z2 e a cepa Colombiana com padrão Z1 (3). Admite-se que essa variabilidade biológica dos biodemas pode representar diferentes desempenhos quando eles são empregados no diagnóstico sorológico da doença de Chagas.

Com o objetivo de contribuir para a melhoria do diagnóstico sorológico da doença de Chagas crônica, testou-se uma amostra de cada cepa de *T. cruzi*: Y, 12-SF e Colombiana, representantes dos biodemas I, II e III. Para tal, foi realizado um estudo com soros de pacientes chagásicos de diferentes áreas do

Brasil. Os soros foram testados nas técnicas imunofluorescência indireta e ELISA, utilizando-se as cepas como antígenos. Através dos resultados, pretendeu-se orientar os fabricantes de *kits* na utilização do antígeno, visando a melhoria do desempenho na identificação dos chagásicos, e, também, contribuir para o melhor controle da infecção pelo *T. cruzi* em serviços de hematologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Para a coleta das amostras sorológicas foram selecionadas as seguintes áreas: Virgem da Lapa (MG), Sertão da Paraíba (PB) e João Costa (PI). Os critérios adotados foram a indicação de interrupção da transmissão vetorial e a presença de diferenças na morbidade, revelada em estudos anteriormente realizados no Departamento de Medicina Tropical, FIOCRUZ.

Painel de soros

Para atender ao objetivo do presente estudo, foram sorteados 541 soros na soroteca do Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, empregando a tabela de números aleatórios. Todas essas amostras de soros *in natura* estão armazenadas em congelador a -20°C, sendo 336 de pacientes chagásicos e 205 de não chagásicos. Os resultados dos soros já haviam sido definidos em estudos sorológicos anteriores, através dos testes de IFI e ELISA com fração antigênica da cepa Y de *T. cruzi*, produzidos e comercializados por Bio-Manguinhos. Dos 541 soros, 179 eram de pacientes de Virgem da Lapa (68 soronegativos e 111 soropositivos), 176 de João Costa (60 soronegativos e 116 soropositivos) e 186 do Sertão da Paraíba (77 soronegativos e 109 soropositivos). Dos 336 soros positivos, 148 eram de pacientes com cardiopatia crônica e 188, de pacientes sem cardiopatia.

Cepas de *T. cruzi*

Foram utilizadas três cepas, representantes dos três biodemas previamente caracterizados por Andrade (4), sendo o primeiro biodema representado pela cepa Y, isolada em São Paulo. Marcada por alta virulência, essa cepa mostrou predominância de formas delgadas e acentuado reticulotropismo no início da infecção, e predominância de formas largas e miotropismo na infecção avançada. O segundo biodema, representado pela cepa 12-SF, isolada no município de São Felipe, apresentou pequeno número de formas delgadas e discreto reticulotropismo no início da infecção, com

predominância de formas largas e de lesões micocárdicas em todo o curso da infecção. No terceiro biotipo, representado pela cepa Colombiana, isolada de um paciente humano da Colômbia, prevaleceram formas largas e mitotropismo em todo o curso da infecção.

Testes sorológicos

Foram produzidos e utilizados os testes de IFI e ELISA. A produção dos *kits* de cada cepa ocorreu no Laboratório de Reativos Diagnósticos de Bio-Manguinhos, mantendo todos os procedimentos técnicos utilizados na produção dos *kits* comercializados.

Imunofluorescência indireta

Consistiu na pesquisa de anticorpos (Ig G) anti-*T. cruzi* em soros com antígeno na forma epimastigota, fixado em lâmina. A presença de anticorpos foi revelada pela antiimunoglobulina humana conjugada com isotiocianato de fluoresceína, e a leitura foi feita em microscópio para fluorescência por epiiluminação. Seguindo as recomendações do laboratório responsável pela produção do kit acerca da conservação, titulação do conjugado, preparo das amostras, leitura e interpretação dos resultados, os testes foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical, FIOCRUZ. Cada amostra de soro foi testada a partir da diluição de 1:20 e demais diluições na razão 2, até a negatificação. Imediatamente após a montagem final da lâmina, a leitura foi feita por dois observadores, sendo utilizado um microscópio da marca Zeiss, modelo HBO 50/AC.

Ensaio imunoenzimático

Consistiu na pesquisa de anticorpos (Ig G) anti-*T. cruzi* em soros com antígenos solúveis e purificados de *T. cruzi* em microplaca. A revelação foi feita pela adição, em etapas sequenciais, de conjugado antiglobulina humana marcada com enzima peroxidase, peróxido de hidrogênio, cromógeno (tetrametilbenzidina) e ácido sulfúrico para interromper a reação. Seguindo as recomendações do laboratório fabricante acerca da conservação, preparo dos componentes e das amostras, leitura e interpretação dos resultados, os testes foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical, FIOCRUZ. As amostras foram testadas na diluição de 1:100 (padrão do kit), e a leitura foi feita em um equipamento automático da marca Lab System, modelo EL-311S, com filtro de 450-630 nm. Foi considerado como índice de reatividade (IR) da amostra o resultado da razão entre a densidade óptica (DO) obtida e o

predominância de formas largas e de lesões micocárdicas em todo o curso da infecção. No terceiro biotipo, representado pela cepa Colombiana, isolada de um paciente humano da Colômbia, prevaleceram formas largas e mitotropismo em todo o curso da infecção.

Testes sorológicos

Foram produzidos e utilizados os testes de IFI e ELISA. A produção dos *kits* de cada cepa ocorreu no Laboratório de Reativos Diagnósticos de Bio-Manguinhos, mantendo todos os procedimentos técnicos utilizados na produção dos *kits* comercializados.

Imunofluorescência indireta

Consistiu na pesquisa de anticorpos (Ig G) anti-*T. cruzi* em soros com antígeno na forma epimastigota, fixado em lâmina. A presença de anticorpos foi revelada pela antiimunoglobulina humana conjugada com isotiocianato de fluoresceína, e a leitura foi feita em microscópio para fluorescência por epiiluminação. Seguindo as recomendações do laboratório responsável pela produção do kit acerca da conservação, titulação do conjugado, preparo das amostras, leitura e interpretação dos resultados, os testes foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical, FIOCRUZ. Cada amostra de soro foi testada a partir da diluição de 1:20 e demais diluições na razão 2, até a negatificação. Imediatamente após a montagem final da lâmina, a leitura foi feita por dois observadores, sendo utilizado um microscópio da marca Zeiss, modelo HBO 50/AC.

Ensaio imunoenzimático

Consistiu na pesquisa de anticorpos (Ig G) anti-*T. cruzi* em soros com antígenos solúveis e purificados de *T. cruzi* em microplaca. A revelação foi feita pela adição, em etapas sequenciais, de conjugado antiglobulina humana marcada com enzima peroxidase, peróxido de hidrogênio, cromógeno (tetrametilbenzidina) e ácido sulfúrico para interromper a reação. Seguindo as recomendações do laboratório fabricante acerca da conservação, preparo dos componentes e das amostras, leitura e interpretação dos resultados, os testes foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical, FIOCRUZ. As amostras foram testadas na diluição de 1:100 (padrão do kit), e a leitura foi feita em um equipamento automático da marca Lab System, modelo EL-311S, com filtro de 450-630 nm. Foi considerado como índice de reatividade (IR) da amostra o resultado da razão entre a densidade óptica (DO) obtida e o

Quadro 1. Características pessoais e clínicas dos pacientes chagásicos com resultados falso-negativos - títulos máximos de soropositividade por biodema avaliado no teste de IFI

Origem	Paciente	Idade	Sexo	Cardiopatia	IFI.Y	IFI.12-SF	IFI.Col
MG	199	59	M	Não	40	40	N
PI	586	78	F	Não	40	40	N
PB	219	41	F	Não	40	40	N
PB	11	75	F	Não	40	40	N
PB	678	45	M	Sim	40	40	N
PB	304	53	F	Sim	40	40	N
PB	425	53	M	Não	40	40	N
PB	61	40	F	Não	80	40	N
PB	459	64	F	Não	80	40	N
PB	27	40	F	Não	80	40	N
PB	408	44	M	Sim	80	40	N
PB	1.202	42	F	Sim	160	40	N
PB	60	51	M	Sim	40	80	N
PB	294	28	F	Sim	80	80	N
PB	591	53	F	Não	80	80	N
PB	603	66	M	Sim	80	80	N
PB	697	43	F	Não	40	N	N
PB	1.231	67	F	Sim	40	N	N

Análise quantitativa. A média dos inversos dos títulos foi maior nos testes com o antígeno da cepa Y (biodema I) e decresceu nos testes com os antígenos das cepas 12 SF (biodema II) e Colombiana (biodema III). Independentemente da área de origem, sexo, faixa etária e cardiopatia dos pacientes, o resultado indicou maior sensibilidade do antígeno da cepa Y para o diagnóstico da infecção chagásica crônica pela técnica de IFI (Tabela 1). E independentemente do antígeno empregado, os testes mostraram maior sensibilidade nos soros procedentes de pacientes de João Costa e nos pacientes com cardiopatia, em que a média dos títulos de anticorpos foi maior, apresentando-se crescente com a faixa etária e não associada ao sexo (Tabela 1).

Tabela 1. IFI: médias dos inversos dos títulos (MIT) das reações nos testes com diferentes antígenos, em função da área de origem, faixa etária, sexo e cardiopatia dos 336 pacientes positivos

Variáveis	Biodema I M ± DP	Biodema II M ± DP	Biodema III M ± DP	A E *p < 0,05
Área de origem				
Virgem da Lapa (n = 111)	252 ± 245	207 ± 187	153 ± 138	Sim
João Costa (n = 116)	346 ± 283	278 ± 274	152 ± 132	Sim
Sertão da Paraíba (n = 109)	149 ± 122	107 ± 79	66 ± 42	Sim
Todas as áreas (n = 336)	251 ± 241	198 ± 210	125 ± 121	Sim
*p < 0,05	Sim	Sim	Sim	
Faixa etária (anos)				
16-29 (n = 12)	203 ± 164	176 ± 168	98 ± 82	Não
30-39 (n = 41)	200 ± 163	183 ± 164	114 ± 106	Sim
40-49 (n = 99)	227 ± 205	162 ± 132	133 ± 134	Sim
50-59 (n = 91)	229 ± 165	188 ± 152	112 ± 95	Sim
60-69 (n = 56)	300 ± 254	233 ± 215	162 ± 150	Sim
> 70 (n = 37)	362 ± 438	298 ± 414	121 ± 112	Sim
*p < 0,05	Sim	Sim	Não	
Sexo				
Feminino (n = 206)	246 ± 260	192 ± 227	115 ± 108	Sim
Masculino (n = 130)	257 ± 211	210 ± 182	145 ± 139	Sim
*p < 0,05	Não	Não	Sim	
Cardiopatia				
Presente (n = 148)	286 ± 303	235 ± 276	146 ± 141	Sim
Ausente (n = 188)	222 ± 175	171 ± 132	112 ± 102	Sim
*p < 0,05	Sim	Sim	Sim	

*Análise de variância; A E = análise estatística; M = média; DP = desvio padrão.

Ensaio imunoenzimático

Análise qualitativa. No total dos testes realizados com os 205 soros negativos, foram registrados 36 (17,6%) soros com resultados falso-positivos em testes com o antígeno do biodema I (com índices de reatividade – DO/cutoff – variando de 1,3 a 1,8); 27 (13,2%) soros com o antígeno do biodema II (com índices de reatividade variando de 1,4 a 2,4) e 33 (16,1%) soros com o antígeno do biodema III (com índices de reatividade variando de 1,3 a 2,1). Nos testes realizados com os 336 soros positivos, 3 (0,9%) soros apresentaram-se com resultados falso-negativos (densidades ópticas inferiores ao cutoff) para cada um dos biodemas utilizados.

Análise quantitativa. Nas 333 amostras que mantiveram a soropositividade inicial, as densidades ópticas variaram de 0,156 a 1,914 para *cut off* das placas em torno de 0,084 (Figura 1). A média das densidades ópticas nos testes com o biodema II foi maior que a apresentada nos testes com os biodemas I e III. A diferença nas médias não foi significativa em função das faixas etárias nos testes em que se empregaram antígenos diferentes. Empregando os antígenos dos biodemas II e III, a média nos homens foi maior do que nas mulheres, assim como no grupo dos pacientes com cardiopatia, em que ela superou os pacientes sem a doença (Tabela 2). A eficiência dos testes com os biodemas I, II ou III não apresentou diferença significativa (Tabela 2). Entretanto, comparando as eficiências dos testes de IFI (Tabela 3) e ELISA (Tabela 4) em função do biodema empregado como antígeno, observa-se que foram maiores os percentuais atribuídos aos testes de IFI para todos os antígenos (Figura 2).

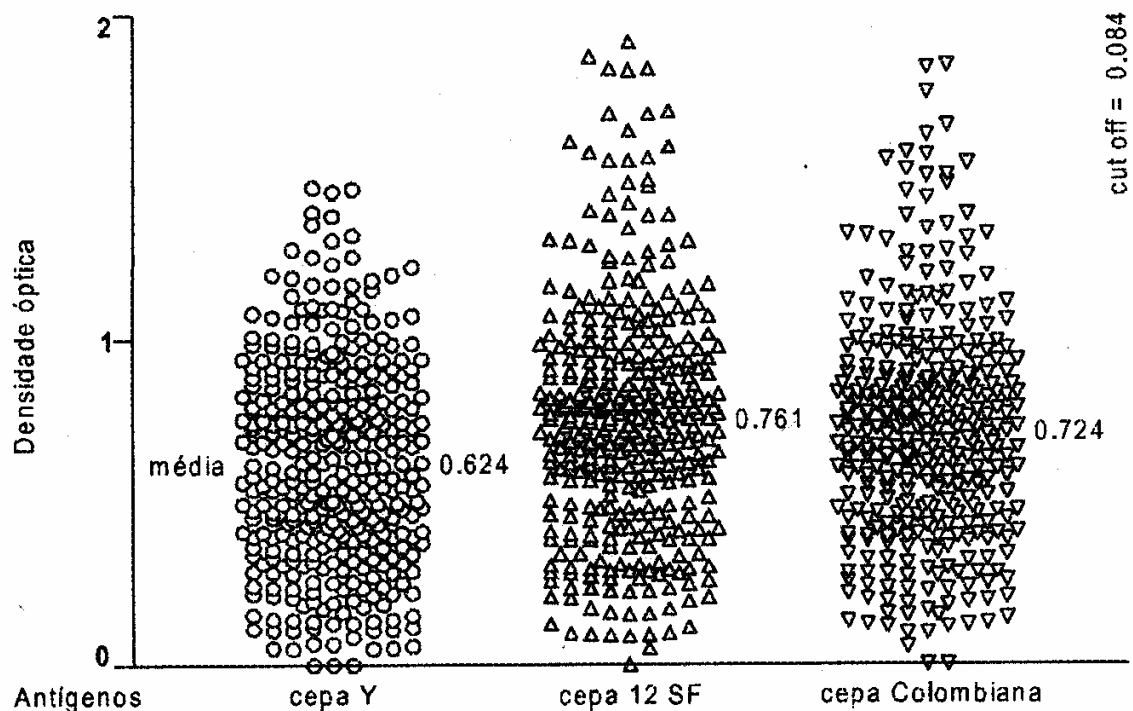


Figura 1. ELISA: distribuição das densidades ópticas das reações realizadas em 336 soros de pacientes chagásicos crônicos, empregando antígenos das cepas de *T. cruzi*: biodemas I, II, e III

Tabela 2. ELISA: médias das densidades ópticas das reações nos testes com diferentes antígenos, em função da área de origem, faixa etária, sexo e cardiopatia dos 336 pacientes positivos

Variáveis	Biodema I M ± DP	Biodema II M ± DP	Biodema III M ± DP	A E *p < 0,05
Área de origem				
Virgem da Lapa (n = 111)	0,683 ± 0,324	0,911 ± 0,362	0,780 ± 0,361	Sim
João Costa (n = 116)	0,743 ± 0,299	0,903 ± 0,290	0,873 ± 0,280	Sim
Sertão da Paraíba (n = 109)	0,435 ± 0,258	0,449 ± 0,239	0,502 ± 0,281	Não
Todas as áreas (n = 336)	0,624 ± 0,323	0,761 ± 0,369	0,724 ± 0,346	Sim
*p < 0,05	Sim	Sim	Sim	
Faixa etária (anos)				
16-29 (n = 12)	0,576 ± 0,362	0,730 ± 0,451	0,722 ± 0,380	Não
30-39 (n = 41)	0,638 ± 0,348	0,735 ± 0,425	0,720 ± 0,364	Não
40-49 (n = 99)	0,584 ± 0,331	0,736 ± 0,349	0,700 ± 0,345	Sim
50-59 (n = 91)	0,664 ± 0,307	0,774 ± 0,383	0,722 ± 0,368	Não
60-69 (n = 56)	0,587 ± 0,315	0,758 ± 0,342	0,740 ± 0,359	Sim
> 70 (n = 37)	0,686 ± 0,291	0,842 ± 0,434	0,775 ± 0,386	Não
*p < 0,05	Não	Não	Não	
Sexo				
Feminino (n = 206)	0,619 ± 0,314	0,705 ± 0,345	0,679 ± 0,334	Sim
Masculino (n = 130)	0,631 ± 0,337	0,851 ± 0,390	0,796 ± 0,354	Sim
*p < 0,05	Não	Sim	Sim	
Cardiopatia				
Presente (n = 148)	0,642 ± 0,328	0,830 ± 0,378	0,772 ± 0,349	Sim
Ausente (n = 188)	0,609 ± 0,319	0,707 ± 0,354	0,687 ± 0,341	Sim
*p < 0,05	Não	Sim	Sim	

*Análise de variância; A E = análise estatística; M = média; DP = desvio padrão.

Tabela 3. IFI: Sensibilidade, especificidade e eficiência dos testes de acordo com os antígenos empregados em 179 soros de Virgem da Lapa, 176 de João Costa e 186 do Sertão da Paraíba - Brasil

Área	Parâmetros	Antígenos das cepas		
		Biodema I Y	Biodema II 12 SF	Biodema III Colombiana
Virgem da Lapa	Sensibilidade	100	100	99,1
	Especificidade	100	100	100
	Eficiência	100	100	99,4
João Costa	Sensibilidade	100	100	99,2
	Especificidade	100	100	100
	Eficiência	100	100	99,4
Sertão da Paraíba	Sensibilidade	100	99,1	89,9
	Especificidade	100	100	100
	Eficiência	100	99,4	94,1
Todas as áreas	Sensibilidade	100	99,7	96,1
	Especificidade	100	100	100
	Eficiência	100	99,8	97,6

Tabela 4. ELISA: Sensibilidade, especificidade e eficiência dos testes de acordo com os antígenos empregados em 179 soros de Virgem da Lapa, 176 de João Costa e 186 do Sertão da Paraíba - Brasil

Área	Parâmetros	Antígenos das cepas		
		Biodema I Y	Biodema II 12 SF	Biodema III Colombiana
Virgem da Lapa	Sensibilidade	98,2	100	100
	Especificidade	77,9	82,3	82,3
	Eficiência	91,6	93,3	93,3
João Costa	Sensibilidade	100	100	100
	Especificidade	81,7	91,7	83,3
	Eficiência	93,7	97,2	94,3
Sertão da Paraíba	Sensibilidade	99,1	97,2	97,2
	Especificidade	87,0	87,0	85,7
	Eficiência	94,0	93,0	92,4
Todas as áreas	Sensibilidade	99,1	99,1	99,1
	Especificidade	82,4	86,2	83,9
	Eficiência	93,1	94,4	93,3

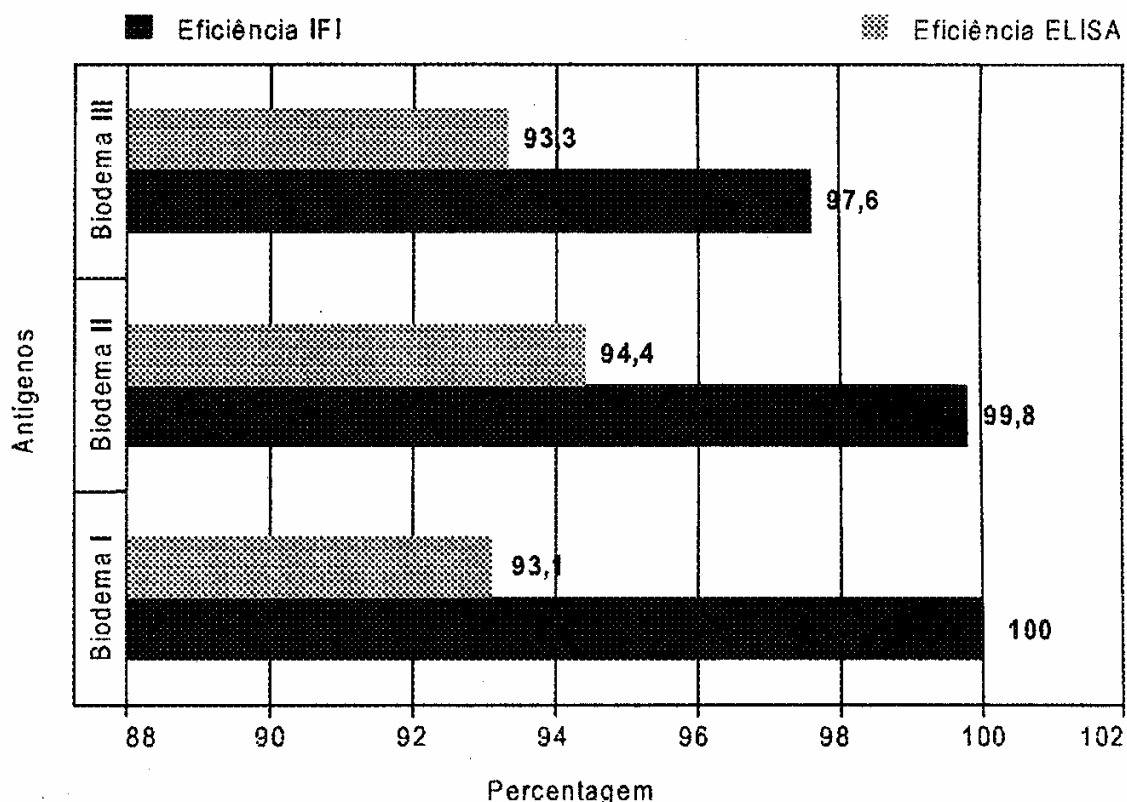


Figura 2. Comparação da eficiência dos testes de IFI e ELISA no diagnóstico sorológico da infecção chagásica crônica empregando os diferentes biodemas de *T. cruzi* como antígeno

DISCUSSÃO

A casuística estudada pode ser considerada representativa de cada área endêmica, visto que sua formação ocorreu de modo aleatório, com amostragem simples. Entretanto a ausência de menores de dez anos, indicativa da interrupção da transmissão vetorial ou mesmo da ausência de transmissão congênita, não permite uma análise do comportamento da imunidade em todas as décadas possíveis.

A variação no tempo de armazenamento dos soros pode interferir nas concentrações e estruturas das imunoglobulinas, determinando variações na reação antígeno-anticorpo e conseqüentemente no desempenho do teste. No presente estudo, os soros *in natura* tinham de 2 a 8 anos de armazenamento, mas nenhuma amostra anteriormente positiva nos testes comerciais apresentou-se negativa concomitantemente nos testes de IFI e ELISA realizados com os antígenos dos biodemas. Sobre esse aspecto, Zauza (26), ao estudar o comportamento de IFI e ELISA em um painel de 835 soros previamente positivos para doença de Chagas, armazenados a -20°C , por um tempo de 3 a 15 anos, observou negatividade somente pela ELISA, em 15 soros (3,7%), 12 deles

armazenados por mais de 10 anos. Isso indica que ELISA é mais sensível do que a IFI na identificação de variações qualitativas e/ou quantitativas das imunoglobulinas anti-*T. cruzi*.

Todos os soros falso-negativos nos testes de IFI, quase que exclusivamente para o antígeno da cepa Colombiana, eram amostras com baixos títulos para os demais antígenos (Quadro 1). Esse baixo nível de anticorpos pode ser o produto da redução gradativa passível de ocorrer em virtude do longo período de armazenamento, conforme registra Willcox et al. (25), ou mesmo das características específicas desses pacientes, identificadas pela baixa reatividade apresentada pelas técnicas de ELISA com todos os tipos de biodemas empregados como antígenos. Essa redução de anticorpos, vale dizer, pode advir também da associação dos dois fatores.

A maior média dos títulos de anticorpos nos soros procedentes do Piauí e a menor nos soros procedentes da Paraíba podem estar associadas, principalmente, com as diferenças regionais dos estímulos antigênicos dos parasitos. Independentemente da área de origem dos soros e do tipo de biodema (antígeno) empregado, a média foi significativamente maior entre os pacientes com cardiopatia, indicando uma associação positiva entre a resposta imune e a intensidade da doença, com a possível participação do sistema imune na geração da cardiopatia chagásica crônica.

Os pacientes mais idosos apresentaram médias de anticorpos superiores às apresentadas pelos mais jovens nos testes de IFI com os antígenos Y e 12-SF. Isso indica que, quanto maior o tempo de infecção, maior será o número de anticorpos contra a superfície dos parasitas representantes desses biodemas. Nos testes com o antígeno da cepa Colombiana não houve associação com a faixa etária, apesar da tendência de crescimento semelhante àquela verificada nos testes com os biodemas I e II.

No total, a média das densidades ópticas da cepa 12-SF foi significativamente maior do que as médias das demais cepas empregadas como antígeno. Isso mostra que os antígenos subcelulares dessa cepa provavelmente apresentam maior potencial imunogênico do que os das cepas Y e Colombiana.

Os pacientes com cardiopatia apresentaram maiores médias de densidades ópticas do que os pacientes sem cardiopatia, de modo significativo nos testes com as cepas 12-SF e Colombiana, à semelhança do observado com as médias dos títulos nos testes de IFI para todos os biodemas empregados como antígenos. Essa observação fortalece a idéia de que há uma associação direta entre a resposta imune humoral e o desenvolvimento de cardiopatia chagásica crônica, independentemente do tipo de antígeno que esteja produzindo o estímulo. Tais dados são semelhantes aos observados por Borges-Pereira et al. (5), Oelemann et al. (16) e Zauza (26). Essa última autora verificou

o aumento dos níveis de anticorpos séricos anti-*T. cruzi* no grupo de pacientes com evolução progressiva da cardiopatia chagásica crônica.

Dentro dos limites do estudo realizado, ao comparar-se o desempenho das técnicas de IFI e ELISA no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, com antígenos de diferentes biodemas, observou-se que a técnica de IFI é mais eficiente do que a técnica de ELISA (Figura 2), o que confere prioridade à primeira técnica. Ao aplicarem-se os testes de IFI, devem ser priorizados aqueles que empregam o antígeno do biodema I (cepa Y); já na utilização dos testes de ELISA, dar-se-á preferência para aqueles que usam antígenos do biodema II (cepa 12-SF) e do biodema III (cepa Colombiana).

As diferenças nos desempenhos de IFI e ELISA, estatisticamente não significativas, decorreram da menor especificidade na técnica de ELISA, que pode ter sido produto de reação cruzada influenciada por anticorpos naturais e heteroanticorpos, contra diferentes epitopos. Essas discrepâncias no desempenho dos testes sorológicos na doença de Chagas crônica, referidas em vários estudos (1, 6, 9, 12, 21, 23), têm sido atribuídas, principalmente, às características dos antígenos empregados em cada teste ou às características das casuísticas e até à influência do fator técnico-laboratorial na padronização e execução da técnica. A análise de todos esses resultados permite considerar boa a reprodutibilidade dos testes empregados, o que amplia a confiança em tais resultados.

AGRADECIMENTOS

Trabalho realizado com o apoio do CNPq – PIBIC.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi: biodemes performance evaluation of serodiagnosis in chronic Chagas disease

In order to evaluate the performance of different antigens and techniques in serodiagnosis of Chagas disease in endemic areas of Brazil, three kits for indirect immunofluorescence test (IFI) and three kits for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were produced, using *T. cruzi* antigens of three different biodemes (I, II and III), representing respectively three strains (Y, 12 SF and Colombiana). Serum samples (541) were tested with known previous results: 336 seropositive and 205 seronegative for anti-*T. cruzi* antibodies tested with IFI and ELISA commercial tests. This serum panel was created by casting, containing 179 serums samples from patients of Virgem da Lapa, Minas Gerais, 176 from patients of João Costa, Piauí and 186 from patients of Paraíba backlands. All serums samples were tested with quantitative indirect immunofluorescence diluted from

1:40 until 1:2560. The serum samples tested with ELISA were diluted 1:100. The IFI analysis of the results showed an efficiency of 100%, 99.8% and 97.6% for biotopes I, II and III respectively, while ELISA test showed an efficiency of 93.1%, 94.4% and 93.3% for biotopes I, II and III respectively. Therefore, these results indicate a better performance with IFI test, mainly using biotope I and with ELISA test using biotope II as antigen. Those values show that results do not depend on sera origin.

KEYWORDS: Chagas disease. Serodiagnosis. Biotopes. Indirect immunofluorescence. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

REFERÊNCIAS

1. Almeida E, Krieger MA, Carvalho MR, Oelemann W & Goldenberg S. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease and blood bank screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 513-517, 1990.
2. Andrade ALSS, Zicker F, Oliveira RM, Silva AS, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, Andrade SS, Andrade JG, Martelli CMT. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 348: 1407-1413, 1996.
3. Andrade SG, Magalhães JB. Biotopes and Zymotopes of *Trypanosoma cruzi*: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 27-35, 1997.
4. Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo baiano (contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Rev Patol Trop* 3: 65-121, 1974.
5. Borges-Pereira J, Willcox HPF, Coura JR. Níveis de anticorpos (IgG) contra *T. cruzi* e freqüências de cardiopatia crônica chagásica em pacientes de duas áreas endêmicas do Brasil. *Anais da II Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas* p 17. 1985.
6. Carvalho MR, Krieger MA, Almeida EC, Oelemann W, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Borges-Pereira J, Saéz-Alquézar A, Dorlhiac-Llaçer PE, Chamone DF, Goldenberg S. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion* 33: 830-834, 1993.
7. Cerisola JA, Chaben MF, Lazzari JO. Test de hemaglutinação para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Prensa Medica Argentina* 44: 1761-1762, 1962.
8. Chagas C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n. sp. agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218, 1909.
9. Dávila EV, Streiger ML, Bovera NM, Fabro D. Comparación de 3 reacciones serológicas para infección chagásica. *Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana XVI*: 99-102, 1982.
10. Estani SS, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel, BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazol in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 59: 526-529, 1998.
11. Fife ER, Muschel LH. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Proceed Soc Exp Biology* 101: 540-543, 1959.
12. Fucs, AP, Fioratti VL, Mello VA, Boianain E. Diagnóstico sorológico na doença de Chagas. Estudo comparativo de diferentes técnicas. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 22: 242-245, 1980.

13. Guerreiro C, Machado A. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Médico* 27: 225-226, 1913.
14. Hoshino-Shimizu S, Camargo ME, Umezawa ES. A rapid slide flocculation test for the diagnosis using *Trypanosoma cruzi* fragments preserved by lyophilization. *Am J Trop Med Hyg* 24: 586-589, 1975.
15. Muniz J, Freitas G. Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 41: 303-333, 1944.
16. Oelemann WMR, Teixeira MGM, Costa GCV, Peralta JM, Borges-Pereira J, Castro JAF & Coura JR. Chagas' disease serology. Reactivity classification of serum panels obtained in four different areas in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91(Supl): 262, 1996.
17. Oelemann WMR, Vanderborcht BOM, Verissimo da Costa GC, Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Castro JAF, Stoops E, Hulstaert F, Zrein M, Peralta JM. A recombinant peptide antigen line immunoassay optimized for the confirmation of Chagas' disease. *Transfusion* 39: 711-717, 1999.
18. Packchianian A. Agglutination and precipitation tests for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease). *J Immunol* 29: 84-85, 1935.
19. Romaña C. Aplicación del método de hemaglutinación al diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev Soc Argent Biol* 37: 73-76, 1961.
20. Silveira AC, Vinhaes MC. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(Supl.I): 405-411, 1999.
21. Teixeira ARL, Pereira LM. Discrepâncias entre resultados de três reações sorológicas empregadas para diagnóstico da doença de Chagas. *Rev Bras Biol* 41: 789-795, 1981.
22. Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Neitzert E, Souza MLNX, Peralta JM. Development and evaluation of an enzyme linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease. *Trop Med Parasitol* 4: 308-312, 1994.
23. Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Peralta JM. Avaliação de testes sorológicos aplicados para a detecção de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Patol Clín* 30: 133-139, 1994.
24. Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett A. A micro-plate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas' disease. *Lancet* 1:426-429, 1975.
25. Willcox HPF, Borges-Pereira J, Coura JR. A sorologia no trabalho de campo - Transporte e conservação. *Rev Soc Bras Med Trop* 22(Supl II): 103, 1989.
26. Zauza PL. Avaliação dos níveis de anticorpos (Ig G) anti-*T. cruzi* em soros de pacientes chagásicos crônicos de Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado, Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000. 137 p.