



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

**MARCELLE BRAL DE MELLO**

**Padronização do *Kit* de ELISA Recombinante para o diagnóstico da  
doença de Chagas visando sua utilização nos Serviços de  
Hemoterapia**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológico.

**RIO DE JANEIRO**  
**2009**

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em  
Imunobiológicos de Manguinhos – Bio-Manguinhos,  
no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica , sob a  
orientação do Prof.Dr. Hilton Jorge e  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Yara Miranda Gomes



**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

**MARCELLE BRAL DE MELLO**

**Padronização do *Kit* de ELISA Recombinante para o diagnóstico da  
doença de Chagas visando sua utilização nos Serviços de  
Hemoterapia**

**ORIENTADORES: Prof<sup>o</sup>. Dr. Hilton Jorge Nascimento e Prof<sup>a</sup>. Dra. Yara Miranda  
Gomes**

**Aprovada em:     /     /**

**Examinadores:**

**Prof. Dr. José Antonio Pinto de Sá Ferreira**

**Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger**

**Prof. Dra. Neiva Sellan Lopes Gonçalves**

**Rio de Janeiro**

Dedico esta dissertação a todos que de algum modo me apoiaram e torceram para que eu chegasse até aqui, mas acima de tudo a Deus, causa primária de todas as coisas e ao meu Filho Pedro, ao meu marido Carlos e aos meus queridos pais, por darem sentido a minha existência.

## **Agradecimentos**

Aos orientadores, Prof<sup>a</sup>. Dra. Yara Miranda Gomes e Dr. Hilton Jorge Nascimento pelos valerosos ensinamentos e sugestões.

À FIOCRUZ e à Direção de Bio-Manguinhos, pela oportunidade e pelas condições propiciadas á realização de uma pós-graduação profissional.

Aos Professores e à coordenação acadêmica do MPTI, que muito contribuíram na minha valorização humana e aos meios acadêmicos para ingresso, manutenção e término do curso.

Ao amigo e chefe do LATED, Edimilson Domingos da Silva por ter acompanhado e incentivado desde a muito, a minha vida profissional em Bio-Manguinhos e por ser um profissional incansável e inspirador de profissionalismo e pela sua imensa contribuição na co-orientação deste trabalho.

Ao amigo e Gerente de Novos Negócios na área de Desenvolvimento Tecnológico na área de Reativos para Diagnóstico, Antônio Gomes Pinto Ferreira, pela ajuda incansável na elaboração desta dissertação e pelos valerosos ensinamentos e incentivo aos trabalhos realizados.

Aos colegas do LATED, especialmente às funcionárias Eliane Coucero Cunha que apoiou e incentivou desde o início ao meu ingresso neste mestrado profissional, e a querida amiga Iamare Rodrigues Pereira do Amaral pela ajuda incansável no trabalho de avaliação dos protótipos.

À Toda equipe de trabalho do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM (FIOCRUZ), chefiado pela Dra. Yara Miranda Gomes por ter me recebido com tanto carinho e por ter me ajudado imensamente na avaliação e na compilação dos resultados dos protótipos em Recife.

Ao Dr. Helio Moraes Souza pela contribuição das amostras do painel do Hemocentro de Uberaba que integraram a avaliação dos protótipos.

Às interfaces de trabalho em Bio-Manguinhos que me deram uma valiosa contribuição na elaboração dos protótipos em especial ao amigo Jorge Batista, gerente do Setor de Soluções e Diluentes, de quem eu nunca ouvi uma negativa.

Aos Dr. Renato Marchevsky e Dr. Geraldo Ârmoa, pelas importantes contribuições durante a banca de acompanhamento da dissertação.

Aos Companheiros do Mestrado Profissional, no qual dividimos boa parte de nossas manhãs, pela cooperação e companheirismo em especial ao grande amigo Roberto Calado por ter compartilhado boa parte dos trabalhos e por termos estabelecido uma parceria harmoniosa nos estudos deste mestrado profissional.

**“O homem semeia um pensamento e colhe uma ação. Semeia um ato e colhe um hábito. Semeia um hábito e colhe um caráter. Semeia um caráter e colhe um destino”.**

**Swami Slivananda**

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	x
LISTAS DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	01
1.1 - Doença de chagas .....	01
1.2 - Agente Etiológico .....	02
1.2.1 - Aspectos Taxonômicos .....	02
1.2.2 - Aspectos Biológicos .....	03
1.2.3 - Estrutura antigênica e cultivo do parasito.....	06
1.3 - Epidemiologia.....	06
1.4 - Transmissão.....	07
1.5 - Patogênese .....	08
1.6 - Aspectos Clínicos.....	09
1.6.1 - Fase Aguda .....	10
1.6.2 - Fase crônica .....	10
1.6.3 - Fase Indeterminada .....	11
1.7 - Resposta Imune .....	11
1.8 - Diagnóstico Laboratorial.....	13
1.8.1 - Diagnóstico Parasitológico .....	14
1.8.2 - Diagnóstico Molecular .....	15
1.8.3 - Diagnóstico Sorológico e triagem.....	18
1.8.3.1 - Teste de Hemaglutinação Indireta (HAI).....	20
1.8.3.2 - Teste de Imunofluorescência Indireta .....	21
1.8.3.3 - Ensaio Imunoenzimático.....	23
1.8.3.4 - Testes sorológicos - Antígenos em uso .....	26
1.8.3.4.1 - Antígenos purificados.....	26
1.8.3.4.2 - Antígenos excretados e secretados.....	26
1.8.3.4.3 - Antígenos recombinantes.....	27

1.8.3.5 - O <i>kit</i> EIE-Recombinante Chagas-Bio-Manguinhos.....	28
1.9 - Racional.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 - Objetivo geral.....	33
2.2 - Objetivo específico.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 - Locais de Experimentação e procedimentos.....	34
3.2 - Produção das proteínas recombinantes.....	35
3.2.1 - Microorganismo transformado .....	35
3.2.2 - Lotes sementes.....	36
3.2.3 - Cultivo e indução da bactéria transformada.....	36
3.2.4 - Rompimento da célula bacteriana.....	37
3.3 - Purificação das proteínas recombinantes.....	37
3.3.1 - Cromatografia de afinidade.....	37
3.3.2 - Cromatografia de troca Iônica e Exclusão Molecular.....	38
3.4 - Conjugação.....	39
3.4.1 - Conjugação da proteína recombinante Histidina-CRA&FRA.....	39
3.4.2 - Conjugação da proteína recombinante $\beta$ -gal-CRA.....	40
3.4.3 - Conjugação da proteína recombinante $\beta$ -gal-FRA.....	41
3.5 - Padronização dos protótipos.....	41
3.5.1 - Determinação dos títulos de antígeno e conjugado – Protótipos 2 e 3 .....	42
3.5.2 - Determinação do título dos conjugados em função do título do antígeno - Protótipo 1.....	43
3.5.3 - Montagem dos protótipos.....	46
3.5.3.1 - Preparo dos calibradores .....	46
3.5.3.2 - Preparo do conjugado.....	47
3.5.3.3 - Sensibilização de placas.....	47
3.6 - Avaliação da padronização dos protótipos.....	47
3.7 - Avaliação do desempenho dos protótipos.....	48
3.7.1 - Critérios de Inclusão e Exclusão das amostras.....	48
3.7.2 - Fase I.....	49
3.7.3 - Fase II.....	50
3.7.4 - Fase III .....	51
3.8 - Análise estatística .....	51



4. RESULTADOS.....	53
4.1 - Expressão das Proteínas Recombinantes.....	53
4.2 - Purificação das Proteínas Recombinantes.....	54
4.2.1 - Histidina CRA&RA.....	54
4.2.2 - Glutathione-S-transferase-CRA&FRA.....	55
4.2.3 - Cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular.....	56
4.3 - Padronização dos protótipos .....	60
4.3.1 - Determinação da concentração do antígeno e do título do conjugado - Protótipo 2 e 3.....	60
4.3.2 - Determinação da concentração do antígeno e do título do conjugado - Protótipo 1 .....	60
4.4 - Avaliação da padronização nos três protótipos.....	63
4.5 - Avaliação do desempenho dos protótipos.....	63
4.5.1 - Fase I.....	63
4.5.2 - Fase II.....	70
4.5.3 - Fase III.....	75
5. DISCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÕES.....	83
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
8. ANEXOS .....	97
8.1 Preparo de Meios e Soluções.....	97
8.2 Proposta de Manual de Instruções.....	99

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$\beta$ -gal	Beta-galactosidase
BSA	Soro albumina bovina
C3	Componente 3 do Complemento
CChc	Cardiomiopatia Chagásica Crônica
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
CD8	“Cluster of differentiation” 8
CD4	“Cluster of differentiation” 4
CQB	Certificado de Qualidade em Biossegurança
CRA	Citoplasmic repetitive antigen
DAF	Fator de aceleração do decaimento
DEGAQ	Departamento de Garantia da Qualidade
DI	Documento Interno
DERED	Departamento de Reativos para Diagnóstico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade Ótica
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
FRA	Flagelar repetitive antigen
GEPRO	Gerência de Projetos
g	Gramma
g	Unidade de rotação
gp	Glicoproteína
GST	Glutathione transferase
HAI	Hemaglutinação Indireta
HIS	Histidina
HIV	Human Immunodeficiency Virus

HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HCl	Ácido Clorídrico
IC	Intervalo de confiança
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL-12	Interleucina 12
IMAC-Ni	Immobilized metal affinity cromatography
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPTG	Iso-propyl $\beta$ -Thiogalactoside
KDNA	DNA do cinetoplasto
KDa	Kilodaltons
L	Litro
LAEAN	Laboratório de experimentação animal
LAMAM	Laboratório de Macromoléculas
LAMEV	Laboratório de Metrologia e Validação
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
LB	Meio de cultivo Luria Bertan
LIT	Liver Infusion triptonase
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ l	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
NaCl	Cloreto de Sódio
NB2	Nível de Biossegurança 2
NK	“Natural Killer”
NNN	McNeal, Novy & Nicolle
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polymerase Chain reaction
pH	Potencial Hidrogênionico
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
POP	Procedimento Operacional Padronizado

q.s.p	Quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
S	Sedimentação
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Poliacrilamida Gel Electrophoresis
SESOD	Seção de soluções e diluentes
SEICA	Seção de insumos, conjugados e apoio
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SUS	Sistema Único de Saúde
TESA	“Tripanomastigote excreted and secreted antigen”
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante alfa
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- $\gamma$	Fator de necrose tumoral gama
Tris	Hidroximetilaminometano
VDTEC	Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico
WHO	World Health Organization
WFI	Water for Injection

## LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1.1</u> – Forma tripomastigota de <i>T.cruzi</i> .....	04
<u>Figura 1.2</u> - Forma epimastigota de <i>T.cruzi</i> .....	05
<u>Figura 1.3</u> - Forma amastigota de <i>T.cruzi</i> .....	05
<u>Figura 1.4</u> – Triatoma Infestans .....	09
<u>Figura 1.5a</u> – IFI Reação Negativa .....	22
<u>Figura 1.5b</u> – IFI Reação Positiva .....	22
<u>Figura 1.6a</u> – Teste EIE - Sistemas de automação.....	25
<u>Figura 1.6b</u> – Teste EIE - Microplaca .....	25
<u>Figura 1.7</u> – Teste EIE direto - Representação Esquemática .....	29
<u>Figura 1.8</u> - Representação esquemática do teste EIE Recombinante Chagas Bio-Manguinhos .....	30
<u>Figura 3.1</u> - Representação esquemática de um teste EIE para determinação da concentração dos antígenos e do título do conjugado.....	44
<u>Figura 3.2</u> - Representação esquemática de um teste EIE para determinação do título dos conjugados .....	45
<u>Figura 3.3</u> - Representação esquemática das avaliações das fases I e II .....	49
<u>Figura 3.4</u> - Fórmulas utilizadas para avaliação estatística.....	52
<u>Figura 4.1</u> - Avaliação da expressão das proteínas recombinantes Histidina -CRA&FRA e GST-CRA&FRA por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE).....	53
<u>Figura 4.2</u> - Avaliação da expressão das proteínas recombinantes $\beta$ -gal-CRA e $\beta$ -gal-FRA por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) .....	54
<u>Figura 4.3</u> - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% das frações da proteína recombinante Histidina CRA&FRA isoladas por cromatografia de afinidade.....	55
<u>Figura 4.4</u> - Eletroforese desnaturante em gradiente de gel de poliacrilamida 8-25% das frações da proteína recombinante Glutathione-S-transferase -CRA&FRA obtidas por cromatografia de afinidade.....	56
<u>Figura 4.5</u> - Cromatografia de troca aniônica em coluna Poros HQ do extrato	

bruto de $\beta$ -gal-CRA.....	57
<u>Figura 4.6</u> - Cromatografia de troca aniônica em coluna Poros HQ do extrato bruto de $\beta$ -gal-FRA.....	57
<u>Figura 4.7</u> - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 do recombinante $\beta$ -galactosidase-CRA.....	58
<u>Figura 4.8</u> - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 do recombinante $\beta$ -galactosidase-FRA.....	58
<u>Figura 4.9</u> - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 7,5% da proteína $\beta$ -gal-CRA purificada.....	59
<u>Figura 4.10</u> - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 7,5% da proteína $\beta$ -gal-FRA purificada.....	59
<u>Figura 4.11</u> – Resultado das densidades óticas dos anti-soros CRA, anti-soros FRA e calibrador negativo no ensaio de padronização do protótipo .....	61
<u>Figura 4.12</u> - Resultado das densidades óticas dos anti-soros CRA, anti-soros FRA e calibrador negativo no ensaio de padronização do protótipo 2.....	62
<u>Figura 4.13</u> - Resultado das densidades óticas dos anti-soros CRA, anti-soros FRA e calibrador negativo no ensaio de padronização do protótipo 1.....	64
<u>Figura 4.14</u> - Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 1 da fase I.....	66
<u>Figura 4.15</u> - Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 2 da fase I.....	68
<u>Figura 4.16</u> - Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 3 da fase I.....	69
<u>Figura 4.17</u> - Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 1 da fase II.....	71
<u>Figura 4.18</u> - Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 2 da fase II.....	72
<u>Figura 4.19</u> - Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 3 da fase II.....	73
<u>Figura 4.20</u> - Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 3 da fase III.....	75

## LISTA DE QUADROS

<u>Quadro 4.1</u> - Resultado da validação do controle positivo e negativo nos Protótipos 1, 2 e 3 .....	73
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 3.1</u> - Combinação binária dos resultados em um teste diagnóstico .....	60
<u>Tabela 4.1</u> - Desempenho do protótipo 1 na fase I de avaliação.....	67
<u>Tabela 4.2</u> - Desempenho do protótipo 2 na fase I de avaliação .....	68
<u>Tabela 4.3</u> - Desempenho do protótipo 3 na fase I de avaliação .....	70
<u>Tabela 4.4</u> - Desempenho do protótipo 1 na fase II de avaliação .....	72
<u>Tabela 4.5</u> - Desempenho do protótipo 2 na fase II de avaliação .....	73
<u>Tabela 4.6</u> - Desempenho do protótipo 3 na fase II de avaliação .....	74
<u>Tabela 4.7</u> - Reatividade das amostras com outras patologias .....	74
<u>Tabela 4.8</u> - Desempenho do protótipo 3 na fase III de avaliação .....	76

## RESUMO

Bio-Manguinhos produz, desde a década de 80, Kits para diagnóstico, inclusive para o diagnóstico da doença de Chagas. O kit EIE-Recombinante-Chagas, que utiliza na sua composição as proteínas recombinantes CRA e FRA do *T. cruzi*, foi registrado como produto junto à ANVISA no ano de 1999. No período de renovação do registro, o Kit passou por uma avaliação prévia no INCQS, onde não foi possível alcançar condição satisfatória quanto aos níveis de sensibilidade.

O presente trabalho teve por objetivo retomar a padronização deste *Kit* no âmbito do desenvolvimento tecnológico. Para tanto foi estabelecido a padronização de três modelos de protótipos, utilizando variações das construções disponíveis das proteínas recombinantes CRA e FRA, na forma de apresentação como antígeno e como conjugado. Posteriormente, foi avaliado o desempenho de cada protótipo, em três diferentes fases. Na primeira fase, o melhor desempenho foi apresentado pelo protótipo 3, cujos níveis de sensibilidade e especificidade foram respectivamente de 99% e 99,5% (IC 95%). Na segunda fase o nível de sensibilidade do protótipo 3 foi de 95,8% e o de especificidade 100%, mantendo a melhor condição de desempenho em relação aos demais. Na última fase, somente o protótipo 3 foi avaliado em função da indisponibilidade de volume das amostras selecionadas e os níveis de sensibilidade e especificidade encontrados de 100%. O desempenho do protótipo 2 foi insatisfatório nas duas primeiras fases de avaliação. Tendo em vista o bom desempenho alcançado pelo protótipo 3, propomos a continuação deste modelo na elaboração futura de lotes-piloto, de estudos multicêntricos e de validação, em ações conjuntas com o controle e a garantia da qualidade para a elaboração de documentação visando pedido de registro desse produto junto aos órgãos regulatórios.



## ABSTRACT

Bio-Manguinhos produces, since the 80's, a variety of kits for diagnosis, including the kit for Chagas' disease diagnostic. The EIE-Recombinant-Chagas' kit, which has in its constitution the recombinant proteins CRA and FRA from *T. cruzi*, was registered at ANVISA as a product in 1999. During the renewal of the registration period, the kit was submitted to a previous registration analysis by The National Institute for Quality Control in Health (INCQS), when it did not show satisfactory sensitivity levels.

The present work aimed to remake the kit standardization process under the scope of the technological development. In order to do it, we established the standardization of three prototype models, each one using variations of available constructions from CRA and FRA recombinant proteins in the form of presentation as antigen and as conjugate. Afterwards, we evaluated the performance of each prototype, in three different stages. In the first one, prototype 3 showed the best performance with 99% sensitivity and 99.5% specificity levels (CI 95%). In the second stage, prototype 3 levels sensitivity and specificity were 95.8% and 100% respectively, keeping the best performance condition as compared to the other two prototypes.

In the last stage, only prototype 3 was assessed due to the lack of sample volumes. The reported sensitivity and specificity levels for such prototype were equal to 100%. The performance of prototype 2 was unsatisfactory in the first two assessment stages. Taking into account the performance achieved by prototype 3, we propose the continuation of this model for future development of pilot lots, multicenter and validation studies, in joint actions with quality assurance and quality control for the arrangement of the documents requested by the National Regulatory Agency for the registration of the product.

# 1 - INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma infecção causada pelo *T. cruzi* que ocorre nas Américas e se estende desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile (Ferreira et al., 2003).

Segundo Schmunis (2007), existem atualmente 7,6 milhões de indivíduos infectados nas Américas, mostrando um claro decréscimo desde meados da década de 80 e início da década de 90 na qual número de casos atingiu aproximadamente 18 milhões. No Brasil, atualmente, estima-se a existência de três e meio milhões de chagásicos, em sua maioria infectados pela via vetorial, intimamente relacionada às baixas condições sócio-econômicas da população e, diante de tal fato, a doença apresenta grande impacto para a Saúde Pública (WHO, 2005).

Clinicamente, a doença é bifásica e caracterizada por uma fase aguda e uma fase crônica. Na fase aguda, devido a uma alta parasitemia, o diagnóstico etiológico é obtido por métodos parasitológicos, enquanto que na fase crônica onde se observa uma baixa parasitemia aliada à um elevado título de anticorpos, a infecção é detectada no soro por meio de métodos imunológicos (Gomes, 1997; Gomes et al., 2004). No entanto, a maioria dos métodos sorológicos comumente empregados apresenta reações cruzadas, contribuindo assim, para resultados falso-positivos durante a triagem dos doadores nos serviços de hemoterapia e conseqüentemente, causando transtornos aos doadores e gastos ao Sistema Único de Saúde (SUS) com o descarte do material coletado (Souza, 2006).

## 1.1 – Doença de Chagas

A doença de Chagas foi descoberta de forma peculiar por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909, em Laissance, interior do estado de Minas Gerais. Nessa época, Carlos Chagas foi incumbido pelo diretor do Instituto Oswaldo Cruz de

executar a campanha contra malária e trabalhava na equipe de pesquisadores de Oswaldo Cruz (Lewinsohn, 1979). Assim, Carlos Chagas foi informado da existência de um inseto hematófago denominado “barbeiro” pelo hábito de sugar sangue da face, habitando os domicílios naturais, atacando o homem à noite, ocultando-se durante o dia nas frestas das paredes, nas coberturas das casas e sendo encontrado em maior número nas habitações pobres, em choupanas de paredes não-rebocadas e cobertas de capim (Pessôa & Martins, 1988).

Examinando o “barbeiro”, Carlos Chagas encontrou protozoários flagelados no intestino posterior de alguns exemplares e resolveu enviá-los ao Rio de Janeiro para que fossem alimentados em uma espécie de sagüi (*Callithrix penicilata*). Ao retornar ao Instituto Oswaldo Cruz, encontrou tripanosomos no sangue periférico de um dos animais, que caracterizou como uma espécie nova, denominada *Schizotrypanum cruzi* (hoje conhecido como *Trypanosoma cruzi*). Foi confirmada também a infecciosidade pela inoculação em vários hospedeiros (coelhos, macacos e camundongos), que apresentaram no sangue as formas parasitárias semelhantes às existentes nos insetos (Chagas, 1910; Lewinsohn, 1979).

O primeiro caso clínico da doença, foi descrito por Carlos Chagas ao observar grande número de formas flageladas de *Trypanosoma cruzi* por microscopia direta do sangue de uma criança de 2 anos de idade, chamada Berenice, que residia em uma cabana infestada de “barbeiros” e apresentava febre, linfadenopatia, baço e fígados aumentados (Chagas, 1910).

Nos anos seguintes, Carlos Chagas descreveu aspectos clínicos e anatomopatológicos e epidemiológicos da doença, além de documentar a presença do parasito em triatomíneos, relatando algumas espécies vetoras transmissoras do parasito e alguns reservatórios silvestres (Ferreira et al., 2003).

## **1.2 - Agente Etiológico**

### **1.2.1 - Aspectos Taxonômicos**

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastida.

A primeira revisão taxonômica realizada para a designação genérica feita por Carlos Chagas ocorreu em 1939, com a mudança de *Schizotrypanum cruzi* para *Trypanosoma cruzi*. Em 1966, Hoare & Wallace dividiram os tripanosomos parasitos

de mamíferos em duas seções, com o *T. cruzi* sendo incluído na seção *Stercoraria*, subgênero *Schizotripanum*, classificação que ainda permanece em uso (Pessoa & Martins, 1988).

Na ordem Kinetoplastida encontramos parasitos com 1 ou 2 flagelos que se originam de uma abertura conhecida como bolsa flagelar, normalmente contendo uma estrutura paraflagelar e uma outra, proeminente, que corresponde a uma condensação de DNA, localizada no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário, conhecida como cinetoplasto (Maslovl et al., 2001).

O gênero *Trypanosoma* é importante dentro da família *Trypanosomatidae* por incluir outras espécies causadoras de doenças em humanos como, por exemplo, o *Trypanosoma rhodesiense* e o *Trypanosoma gambiense*, causadores da doença do sono, e em animais, como o *Trypanosoma brucei*, o *Trypanosoma equiperdum* e o *Trypanosoma equinum* (Ferreira et al., 2003).

A seção *Stercoraria* inclui tripanossomas que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, progredindo no sentido da porção intestinal com liberação de formas infectivas (tripomastigotas metacíclicas) nas fezes do vetor contaminado (Ferreira & Ávila, 2001).

A comparação de sequências gênicas de 18S rRNA de várias espécies de tripanosomas obtidos em diferentes hospedeiros, combinada a outras ferramentas moleculares sugere que o gênero *Trypanosoma* seja monofilético. Dados pré-históricos indicam que os seres humanos foram expostos à tripanosomíase americana concomitantemente à sua evolução. No entanto, os tripanosomas evoluíram independentes do *Homo sapiens* e só se juntaram aos seus hospedeiros há 12-40 mil anos, quando o homem chegou ao continente americano. O DNA do *T. cruzi* já foi encontrado em tecidos humanos mumificados da América do Sul com data de 4 mil anos (Barrett et al., 2003).

### 1.2.2 - Aspectos Biológicos

Em seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas que podem ser identificadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo (Brener, 1997).

Nas formas tripomastigotas (forma infectante não replicativa) o cinetoplasto situa-se posteriormente ao núcleo, em posição tanto terminal quanto subterminal, com o flagelo emergindo lateralmente da bolsa flagelar, localizada próximo ao

cinetoplasto se estendendo junto ao corpo do parasito formando uma membrana ondulante. Os tripomastigotas (Figura 1.1) são formas extracelulares, alongadas, encontradas no sangue dos hospedeiros vertebrados e na extremidade distal do tubo digestivo dos triatomíneos (Brener,1997).

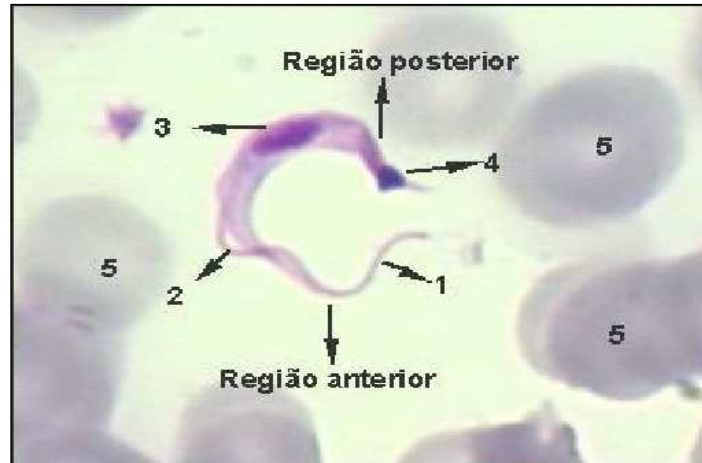
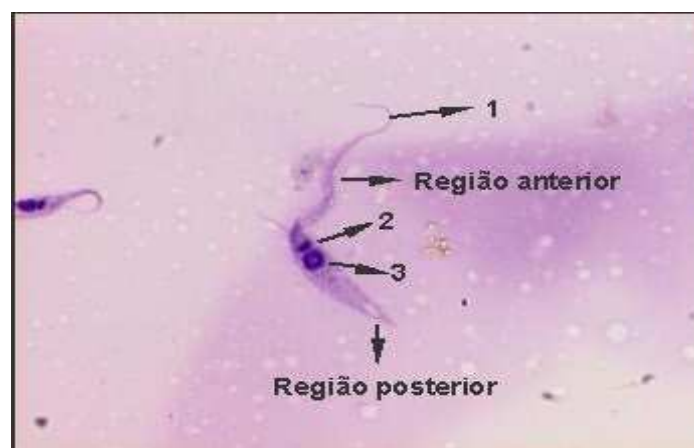


Figura 1.1 - Forma tripomastigota de *T. cruzi* 1. Flagelo livre (região anterior); 2. Flagelo aderido ao corpo celular 3.Núcleo; 4.Cinetoplasto arredondado (região posterior); 5.Hemácias Adaptada do site da UFRJ: <http://www.biof.ufrj.br/laminario.html>, 2007.

Os epimastigotas (Figura 1.2), são formas extracelulares, alongadas e replicativas, com o cinetoplasto e a bolsa flagelar em posição anterior ou próxima ao núcleo e o flagelo emergindo lateralmente. São formas encontradas no intestino médio dos triatomíneos e em cultivo axênico onde se multiplicam por divisão binária (Brener,1997).



livre (região anterior); 2.Cinetoplasto em forma de bastão (próximo ao núcleo) 3.Núcleo. Adaptada do site da UFRJ: <http://www.biof.ufrj.br/laminario.html>, 2007.

As formas amastigotas (Figura 1.3) são estruturas replicativas encontradas dentro de células hospedeiras constituindo organismos arredondados sem flagelo livre ao microscópio óptico (Hoare & Wallace, 1966).

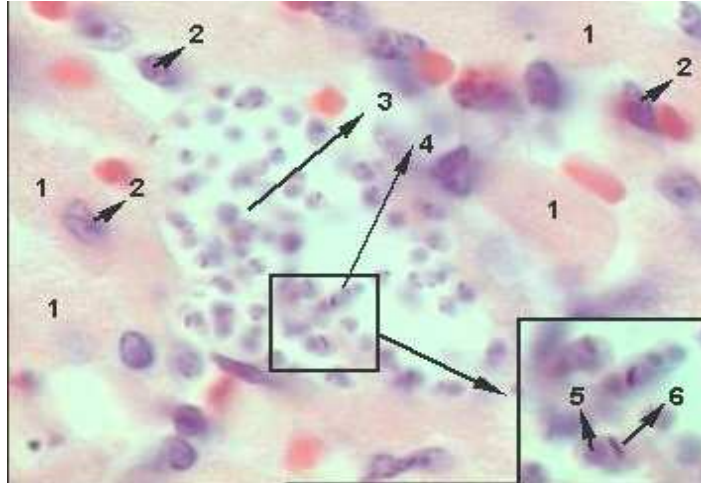


Figura 1.3 - Forma amastigota de *T. cruzi* 1.Célula muscular; 2.Núcleo da célula muscular 3. Ninho de amastigotas; 4.Amastigota; 5.Núcleo da amastigota; 6.Cinetoplasto anterior em forma de bastão. Adaptada do site da UFRJ: <http://www.biof.ufrj.br/laminario.html>, 2007.

O *T. cruzi* apresenta aspectos diversos dependendo de sua localização no organismo do vertebrado ou do inseto transmissor. No homem e nos outros vertebrados apresenta-se sob a forma de tripomastigota no sangue periférico e, nas células dos tecidos, sob a forma amastigota. Sua divisão não ocorre no sangue periférico e a sua reprodução se processa somente nos tecidos. A transformação das formas teciduais em sanguíneas ocorre com o aparecimento de estruturas intermediárias epimastigotas-*like*, consideradas mais curtas que as formas epimastigotas presentes no inseto (Pessôa & Martins, 1988).

As formas amastigotas são encontradas principalmente nas células do retículo-endotelial ou nas fibras musculares. Após a penetração dos tripomastigotas nas células, os mesmos transformam-se em amastigotas e se multiplicam por divisão binária a cada doze horas. Essas formas preenchem o citoplasma da célula e evoluem para a forma tripomastigota. O citoplasma se rompe, liberando os tripomastigotas para a circulação. Parte desses parasitos é destruída pelas defesas

do organismo e aqueles que escapam, invadem outras células ampliando os processos patogênicos da infecção (Coura, 2003).

### 1.2.3 - Estrutura antigênica e cultivo do parasito

Para estudos diagnósticos e produção de antígenos pode-se manter o parasito em laboratório por meio dos próprios triatomíneos (criação artificial), inoculação em animais (especialmente camundongos albinos, cobaias e hamsters), criopreservação ou *in vitro*, utilizando diferentes meios de cultivo. Preferencialmente são usados meios monofásicos líquidos como o LIT (*liver infusion tryptose*) largamente disseminado e com excelente rendimento (Hoare & Wallace, 1966).

Em meios de cultura acelulares como o LIT e o NNN (Mc Neal, Novy & Nicolle) que é um composto de ágar-sangue+LIT, o *T. cruzi* desenvolve um ciclo evolutivo semelhante ao descrito no vetor, apresentando formas arredondadas denominadas tripomastigotas sanguíneas, infectantes para o hospedeiro vertebrado, semelhantes às esferomastigotas do vetor ou formas epimastigotas, não infectantes para o hospedeiro vertebrado. Os epimastigotas se multiplicam por divisão binária simples e posteriormente se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (Lana & Tafuri, 1995).

A superfície celular do *T. cruzi* é complexa apresentando principalmente glicoproteínas e glicolipídios em sua composição. Esta complexidade estrutural reflete a grande variedade de funções realizadas pela membrana do parasito desde a penetração na célula hospedeira até a resistência aos mecanismos de defesa, tanto no intestino médio dos insetos quanto nas células do hospedeiro vertebrado (Takle & Snary, 1992; Frasc, 2000).

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* secretam ou excretam uma variedade de moléculas de membrana, espontaneamente, no meio em que vivem durante o curso da infecção, por meio de um mecanismo conhecido como *shedding*, funcionando como mecanismo de evasão do parasito em relação ao sistema imune do hospedeiro (Schmunis et al., 1998).

## 1.3 - Epidemiologia

No contexto histórico, a doença de Chagas apresenta um ciclo doméstico com taxas de mortalidade significativas, antecedido de um ciclo silvestre mais antigo e restrito (Dias, 2000).

A enzootia é o processo de manutenção da infecção na natureza (ciclo silvestre) onde mais de 100 espécies de animais já foram identificados como portadores da infecção pelo *T. cruzi*, com a circulação do protozoário entre vetores e reservatórios silvestres, ao longo da maior parte do continente americano. Os triatomíneos silvestres podem eventualmente infectar o homem (antropozoonose) e os animais domésticos, no seu habitat natural. Nestas circunstâncias ocorre o aparecimento de casos ocasionais da doença de Chagas (Pessoa & Martins, 1988).

A infecção ou doença de Chagas como zoonose é intercambiada de forma endêmica entre os animais e o homem por meio de vetores. Fatores bioecológicos e político-sociais aproximaram populações humanas do ciclo enzoótico ao longo do novo continente, promovendo a dispersão da endemia chagásica devido a movimentação do homem por grandes áreas. No ciclo doméstico, o homem sobressai como o principal reservatório da infecção, levando o parasito para as zonas urbanas e para novas regiões e países não-endêmicos. No século atual, as condições ecológicas e sociais modificaram-se resultando na urbanização de grandes contingentes de infectados e surgindo, em particular, uma nova e importante forma de transmissão da doença de Chagas, a transmissão transfusional (Dias, 2000; Coura, 2007; Ferreira et al, 2003; Teixeira et al., 2006a).

O Brasil recebeu em 09 de junho de 2006 a certificação internacional da Organização Pan-Americana da Saúde de eliminação da transmissão da doença pelo *Triatoma infestans*. Todavia, isso não representa o controle efetivo da doença no país e nem a erradicação da mesma implica na interrupção definitiva da transmissão (Ferreira & Silva, 2006).

#### **1.4 - Transmissão**

A transmissão vetorial é a de maior importância epidemiológica sendo o *T. cruzi* transmitido por insetos hematófagos da subfamília *Triatominae* (família *Reduviidae*, ordem *Hemiptera*). Das espécies vetores há algumas que possuem maior importância na transmissão da doença de Chagas, por serem capazes de invadir e procriar dentro de casas, fenômeno conhecido como domicialização, sendo as principais: *Triatoma infestans*, nos países do cone sul e Peru (Figura 1.4), *Rhodnius prolixus*, no norte da América do Sul e na América Central, *Panstrongylus megistus*, no leste e centro do Brasil, *Triatoma braziliensis*, no nordeste do Brasil e *Triatoma dimidiata*, na América Central (Stothard et al., 1999).





Figura 1.4 - *Triatoma infestans*. Adaptada do site IPEC/FIOCRUZ, disponível em <http://www.ipef.fiocruz.br/pepes/dc/dc.html>, 2007.

Nas áreas urbanas, a transmissão por transfusão de sangue e derivados é considerada a segunda via mais importante de transmissão da doença, como consequência da migração de populações de áreas endêmicas para centros industrializados, em busca de trabalho. (Bonametti et al., 1998; Ferreira & Ávila, 2001; Prata, 2001).

A terceira via de transmissão mais importante é a congênita pois o *T. cruzi* pode atravessar a barreira placentária. A probabilidade de transmissão congênita entre crianças filhas de mães chagásicas na América Latina varia de 1% a 10% com aproximadamente, 5000 a 8000 novos casos por ano. Este tipo de transmissão pode ocorrer fora de áreas endêmicas (Prata, 2001).

Outras vias que contribuem para a transmissão da doença incluem os transplantes de órgãos infectados, capazes de desencadear doença aguda grave, pelo fato de os indivíduos transplantados utilizarem drogas imunossupressoras e, conseqüentemente, tornarem-se menos resistentes à infecção, além das transmissões por acidentes ocupacionais em laboratórios ou hospitais (Dias et al., 2002).

Microepidemias da doença de Chagas aguda podem ocorrer por meio da transmissão oral, pela ingestão de alimentos contaminados com as fezes de triatomíneos, tais como carnes, suco de cana de açúcar ou açaí. No Brasil essas microepidemias ocorreram a partir de 1965, no Rio Grande do Sul, Paraíba, e mais recentemente, em Santa Catarina, Amazonas, Ceará, Bahia, e 30 localidades no Pará e Amapá (Coura, 2006).

## 1.5 - Patogênese

O *T. cruzi* ao penetrar no hospedeiro vertebrado, produz uma reação inflamatória local aguda. A disseminação linfática leva os parasitos para os nodos

linfáticos da região, onde são ingeridos por histiócitos (SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear) ou por outras células, sem grande capacidade fagocitária, e se transformam em amastigotas. Os tripomastigotas podem, alternativamente, invadir ativamente os macrófagos e outras células. Depois da multiplicação local, os parasitos podem assumir a forma tripomastigota para invadir a corrente sanguínea, levando a infecção a todas as partes do corpo. Ocasionalmente, a célula hospedeira rompe-se antes da conversão de amastigotas em tripomastigotas. Os primeiros, eventualmente liberados, também apresentam capacidade de penetração em algumas células hospedeiras (Teixeira et al., 2006a).

Os parasitos quando sob a forma amastigota, podem multiplicar-se dentro das células de quase todos os órgãos e tecidos, como o sistema reticuloendotelial, coração, músculos esqueléticos e lisos, além das células da neuroglia que são preferencialmente parasitadas. À medida que a infecção se dissemina além dos nodos linfáticos regionais aparecem tripanosomos no sangue circulante, infectando outros órgãos e tecidos e sendo levados para todo o corpo. As células de *küpf*er do fígado, os macrófagos do baço e o músculo cardíaco são especialmente sujeitos à infecção (Markell et al., 2003).

## 1.6 - Aspectos Clínicos

A doença de Chagas apresenta duas formas clínicas distintas: a fase aguda, com surgimento rápido logo após a infecção e a fase crônica, que pode aparecer após diversos anos, com efeitos irreversíveis em órgãos internos como o coração, esôfago, cólon e também no sistema nervoso periférico (Markell et al., 2003).

Substâncias ou condições que provocam imunodepressão podem reativar a doença de Chagas com a proliferação do parasito. Em 75% dos casos podem ocorrer lesões necróticas ou tumorais no cérebro e em 44% dos casos intensificação de miocardites. Isto ocorre freqüentemente em co-infecções com HIV (vírus da imunodeficiência humana), em que as células TCD4+ do sangue periférico estão em número inferior a 200 células/ microlitro ( $\mu$ L) e em indivíduos transplantados de órgãos (Prata, 2001).

A doença é observada geralmente em sua forma mais grave, em crianças com menos de cinco anos de idade, onde podem predominar sintomas de comprometimento do sistema nervoso central. Em adultos e crianças maiores de 5

anos a doença ocorre em geral de modo mais brando, na forma subaguda ou crônica (Markell et al., 2003).

### **1.6.1 - Fase aguda**

O quadro clínico da doença aguda instala-se tipicamente nos primeiros dias ou meses após a infecção primária e dura de quatro a doze semanas, quando não há tratamento. A maior parte das infecções agudas é assintomática ou inaparente e caracteriza-se por febre baixa e mal estar, acompanhada de linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Nesta fase, o parasito encontra-se disseminado e pode ser facilmente visualizado em exame de sangue direto. Os sinais de porta de entrada do parasito são valiosos e quando aparentes, podem ser observados o chagoma de inoculação (cutâneo) ou o sinal de Romaña, na mucosa ocular (Coura, 2003).

### **1.6.2 - Fase Crônica**

Mais de 90% dos doentes com manifestações clínicas da fase aguda sobrevivem à infecção inicial. Após um período que varia de 2 a 4 meses, a parasitemia torna-se não detectável pelos métodos diretos e após a soroconversão, tanto as imunoglobulinas da classe M quanto G, são detectáveis com a última aparecendo mais tardiamente. A seguir, inicia-se um período no qual a doença torna-se assintomática, em que poderá ou não haver manifestação clínica e, no último caso, anos ou décadas mais tarde, ocorrer o aparecimento das formas crônicas cardíaca, digestiva, nervosa ou mista (Gascón, et al., 2007).

A forma crônica cardíaca manifesta-se em uma pequena parcela de pacientes. O achado clínico mais comum é a insuficiência cardíaca congestiva, acompanhada de alterações eletrocardiográficas típicas. Em casos mais avançados ocorrem cardiomegalia, arritmias complexas e morte súbita. Na forma digestiva há destruição dos plexos nervosos ao longo do trato digestivo ocasionando alterações funcionais e morfológicas como o megaesôfago e o megacólon. Podem também ocorrer formas mistas em que se associam sintomas digestivos e cardíacos (Markell et al., 2003).

### 1.6.3 - Fase Indeterminada

Uma vez terminada a fase aguda, a maioria dos indivíduos infectados retorna ao estágio assintomático, porém com exames parasitológicos positivos. Os exames clínicos são normais, o eletrocardiograma basal e os exames radiológicos de coração, esôfago e intestino grosso também não apresentam alterações. Em cerca de 40% dos pacientes pode-se demonstrar a presença de parasitos no sangue periférico por meio de métodos indiretos como o xenodiagnóstico e a hemocultura, além de anticorpos contra o *T. cruzi* em testes sorológicos (Teixeira et al., 2006b).

Esse período assintomático é conhecido como forma indeterminada da fase crônica da doença, cursando usualmente por 10 a 20 anos, entre o fim da fase aguda e o estabelecimento da fase crônica da doença. Nessa fase, o indivíduo pode evoluir ou não, para a forma cardíaca, digestiva ou nervosa da doença e cerca de 30% desses pacientes podem desenvolver miocardiopatia crônica progressiva (Prata, 2001; Markell et al., 2003).

### 1.7 - Resposta imune

A maioria das manifestações clínicas da doença de Chagas se deve à resposta imune dirigida ao parasito. A mobilização do sistema imune é fundamental para a redução da carga parasitária. No entanto, a sua atuação pode também contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas observadas em alguns pacientes. Tanto indivíduos sintomáticos quanto assintomáticos de fase indeterminada apresentam resposta imunológica contra o parasito (Broadsky & Barral-Neto, 2000).

A resposta imune inata age como um componente chave da resistência do hospedeiro contra protozoários, controlando seu crescimento durante a infecção. As células natural killer (NK) desempenham papel importante nesta fase, limitando o crescimento parasitário, bem como, promovendo o desenvolvimento da imunidade celular adquirida. Os mecanismos principais desempenhados pelas células NK se relacionam com o papel lítico ou destruição das células-alvo e com a produção de citocinas envolvidas na sensibilização de outras células imunes, no microambiente onde a resposta imune está se desenvolvendo (Broadsky & Barral-Neto, 2000).

Estudos recentes têm demonstrado que a infecção dos macrófagos pelo *T. cruzi* pode induzir a secreção de interleucina 12 (IL-12) por essas células, levando a um aumento da produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e do fator de necrose tumoral

alfa (TNF- $\alpha$ ) com o consequente controle da parasitemia e da mortalidade (Broadsky & Barral-Neto, 2000). Entretanto, segundo Soares et al, (2001), existe uma associação entre a intensidade da cardiomiopatia chagásica crônica e a produção de altos níveis de IFN- $\gamma$  na infecção humana, sugerindo que esta citocina pode tanto atuar no controle da parasitemia, quanto atuar como um mediador crítico dessa cardiomiopatia.

Acredita-se também que os protozoários ativem as funções das células NK por meio de mecanismos indiretos envolvendo a estimulação e produção de monocinas pelas células apresentadoras de antígenos. Os glicolipídios são de grande importância como indutores da produção de monocinas (IL-12 e TNF- $\alpha$ ) e funcionam como âncoras na interação com as células NK e na indução da produção de tais citocinas. A atuação das células NK é de natureza transitória nos hospedeiros infectados sugerindo que sua atividade seja rigorosamente controlada (Broadsky & Barral-Neto, 2000).

Consistente a essa hipótese, citocinas como a interleucina 10 (IL-10) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) têm demonstrado inibir a síntese de IFN- $\gamma$  induzida pelo parasito, bem como a lise pelas células NK, e desta forma teriam um papel importante no controle da produção de citocinas pró-inflamatórias que, em excesso, poderiam contribuir para as lesões teciduais observadas posteriormente na doença de Chagas (Soares, 2001).

Outro aspecto relevante na resposta imune inata está relacionado com a resistência de formas tripomastigotas do *T. cruzi* à ação do complemento por meio de proteínas codificadas pelo parasito, bloqueando a via alternativa e inibindo a formação da C3 convertase. As proteínas que apresentam essas propriedades são a glicoproteína (gp) 160, similar ao DAF humano (proteína basal presente na membrana celular), a gp58/68 e uma proteína com peso molecular entre 87 e 90 Kilodalton (kDa). De acordo com Martin & Tarleton (2004), a infecção pelo *T. cruzi* também induz a secreção de proteínas da fase aguda, tais como a proteína C reativa, a amilóide-P-sérica e a  $\alpha$ -2 macroglobulina ( $\alpha$ -2M) .

Na resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi* participam tanto a resposta humoral como a celular. Foi demonstrado que a imunidade mediada por anticorpo está associada principalmente às imunoglobulinas da classe G (IgG) (imunoglobulina G). Na imunidade humoral, os anticorpos constituem um importante componente de defesa contra o *T. cruzi*, havendo mudanças no perfil das imunoglobulinas durante as diferentes fases da doença. Clones de células T de

pacientes chagásicos assintomáticos, obtidos a partir das células mononucleares do sangue periférico, são predominantemente TCD4+, enquanto os obtidos a partir de pacientes com sintomas cardíacos ou gastrointestinais exibem fenótipo de células TCD8+, sugerindo uma possível participação dessas células na imunopatologia da doença (Martin & Tarleton, 2004).

Durante a fase crônica da doença é comum a observação no coração dos pacientes, de focos de infiltrados de células mononucleares, onde predominam células TCD8+, alguns macrófagos e as fibras destruídas (infectadas ou não) encontram-se em íntima associação com linfócitos TCD4+ ou TCD8+. A falta de associação entre parasitismo tecidual e inflamação, aliada à observação das fibras destruídas mesmo sem a detecção do parasito no local, sugere que a resposta patogênica na cardiomiopatia chagásica crônica não é somente direcionada contra antígenos do *T. cruzi*, mas também a auto antígenos. No entanto, a resposta anti-*T. cruzi* pode induzir lesões e contribuir para a cardiomiopatia (Teixeira et al., 2006a).

O mimetismo de antígenos próprios por antígenos parasitários pode induzir a uma resposta cruzada, auto-imune, contra epítomos presentes nas proteínas do hospedeiro, provocando uma quebra no balanço da resposta imune em relação à autotolerância, levando ao aparecimento da auto-imunidade (Soares, 2001; Teixeira et al., 2006b).

## 1.8 - Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da doença de Chagas pode ser realizado por métodos parasitológicos, radiológicos e sorológicos, apoiado pela epidemiologia, clínica e etiologia. Os métodos de diagnóstico podem basear-se na detecção direta do parasito ou na detecção da resposta do hospedeiro à invasão do parasito. Os exames laboratoriais também devem levar em consideração a fase da infecção. Na fase aguda da doença observa-se alta parasitemia, presença de anticorpos inespecíficos e início de formação de alguns anticorpos específicos (IgM e IgG). Nessa etapa, recomenda-se dar prioridade a exames parasitológicos enquanto na fase crônica, ao contrário, observa-se baixíssima parasitemia, presença de anticorpos específicos (IgG) e indica-se o uso de testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos específicos contra o parasito (Ferreira & Ávila, 2001; Luquetti, 1999).

Todo teste laboratorial deve ter sensibilidade e especificidade conhecidas. A sensibilidade indica a capacidade do teste em detectar todos os indivíduos

infectados e um teste pouco sensível deixará de identificar alguns indivíduos portadores da infecção. Por outro lado, a especificidade indica a capacidade do teste em detectar a população não-infectada e quanto maior a especificidade do teste maior será a sua capacidade de detecção dos indivíduos não-infectados. Segundo Luquetti & Rassi (2000), não existe um teste com 100% de sensibilidade e especificidade.

Visando o aumento desses parâmetros algumas estratégias podem ser utilizadas, tais como, o emprego de mais de um teste, a repetição da coleta do material e nos exames sorológicos, o uso de diferentes pontos de corte (*Cut-off*) que representam a concentração de anticorpos que delimitam a população não-infectada da infectada. Para que isso aconteça, é importante definir o objetivo a que se pretende o diagnóstico laboratorial. Se, por exemplo, for realizar o diagnóstico de um paciente, escolhem-se testes com elevada especificidade, evitando-se assim, um resultado falso-positivo. Ao contrário, em situações em que se pretende impedir a transfusão de sangue oriundo de indivíduos falso-negativos, como ocorre nos serviços de hemoterapia, o cenário é a escolha de testes com elevada sensibilidade (Medronho & Perez, 2002).

### **1.8.1 - Diagnóstico Parasitológico**

O diagnóstico parasitológico pode ser direto ou indireto. Entre os métodos diretos mais usados, destaca-se a microscopia direta, onde o sangue é examinado entre lâmina e lamínula, durante as seis primeiras semanas da doença. Variáveis do método direto como a gota espessa ou a concentração do sangue (concentração de Strout e de Ficoll-Hypaque) e a técnica do micro-hematócrito aumentam a chance da detecção de baixas parasitemias (Luquetti & Rassi, 2000). Uma alternativa promissora o *Quantitative Buffy Coat* (QBC<sup>®</sup> METHOD) tem sido aplicada com sucesso na pesquisa de tripanosomos, quando os níveis de parasitemia são baixos (Ferreira & Ávila, 2001).

Entre os métodos indiretos utilizam-se o xenodiagnóstico e a hemocultura. O xenodiagnóstico consiste na alimentação de ninfas de triatomíneos livres de infecção com o sangue de pacientes. Os parasitos presentes multiplicam-se no tubo digestivo do vetor. As fezes das ninfas e o intestino são examinados após um período de quatro a seis semanas por microscopia direta para pesquisa de *T. cruzi*. Pode-se realizar o xenodiagnóstico natural, que consiste na alimentação de ninfas

diretamente sobre a pele dos pacientes ou o artificial, em que as ninfas dos triatomíneos são alimentadas através de membranas contendo sangue do paciente colhido com anticoagulante. O xenodiagnóstico artificial tem sido cada vez mais usado com resultados comparáveis e até melhores do que o natural (Luquetti & Rassi, 2000). A sensibilidade do xenodiagnóstico artificial na fase crônica varia entre 9% e 87,5%, dependendo da área endêmica em estudo, podendo gerar um número significativo de resultados falso-negativos e entre 85% e 100% na fase aguda (Ferreira & Ávila, 2001; Luquetti & Rassi, 2000). O emprego rotineiro dessa técnica fica restrito devido à sensibilidade e às limitações inerentes à mesma, tais como, o tempo prolongado para a liberação do resultado final, que pode levar até 90 dias, a necessidade de criação de triatomíneos em laboratório, eventuais perdas dos insetos durante de realização do teste e a rejeição do paciente à aplicação repetida do exame em sua forma natural (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003).

A hemocultura baseia-se no mesmo princípio do xenodiagnóstico, onde os parasitos eventualmente presentes no sangue periférico dos pacientes podem ser encontrados com maior facilidade após uma etapa de multiplicação de epimastigotas em cultura *in vitro*. A hemocultura é utilizada desde a década de 50, no entanto não havia um consenso técnico e diversos foram os desempenhos encontrados desde os trabalhos pioneiros de Albuquerque et al (1972). Embora apresente uma sensibilidade limitada, trata-se de uma metodologia bastante utilizada para isolar cepas responsáveis por infecções no homem e em animais. Atualmente o consenso com relação à técnica visando a melhoria da sensibilidade do teste envolve as seguintes variáveis: o volume de sangue colhido, de preferência, 30 mL (mililitros) e não inferior a 20 mL, a coleta de maior número de hemoculturas, aumento do tempo de observação, o emprego do meio de cultura LIT e menor tempo entre a coleta e o processamento da amostra (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003).

### **1.8.2 - Diagnóstico Molecular**

A reação em cadeia da polimerase – “Polymerase Chain Reaction” (PCR) consiste na amplificação de seqüências tanto de DNA do cinetoplasto quanto do DNA nuclear de *T. cruzi* (Britto et al., 1995a)

O genoma mitocondrial do *T. cruzi* constituído pelo DNA do cinetoplasto (KDNA), representa cerca de 20% do DNA celular total e é organizado em uma estrutura em rede, onde minicírculos encontram-se encadeados representando 95%



do conteúdo do kDNA. Algumas dessas seqüências repetitivas são utilizadas como alvo de amplificação na reação de PCR, como um fragmento de 330 pares de bases do kDNA (Kirchhoff et al., 1996).

Estudos clínicos e epidemiológicos preliminares demonstraram que o ensaio de PCR pode alcançar uma melhor sensibilidade e especificidade, quando associado ao diagnóstico sorológico e clínico. Além disso, a reação de PCR é sem dúvida, um método mais rápido e mais prático do que quaisquer outros testes parasitológicos, como o xenodiagnóstico e o hemocultivo. O desempenho do método de PCR foi testado em um estudo pioneiro, para avaliação e acompanhamento de terapia específica para a doença de Chagas, em um grupo de 32 indivíduos soropositivos tratados, que vinham sendo acompanhados no Hospital de Doenças Infecciosas da Fundação Oswaldo Cruz (Atual Instituto de Pesquisas Evandro Chagas, IPEC) no Rio de Janeiro. Os resultados demonstraram um sinal positivo de amplificação em apenas 9 dos 32 pacientes que permaneceram reativos pelos testes sorológicos convencionais, até um período médio de 5 anos pós-tratamento (Britto et al., 1995a).

Uma série de investigações em regiões endêmicas do Brasil com perfis epidemiológicos particulares foi conduzida com base na amplificação de seqüências de minicírculos do kDNA. Inicialmente, os ensaios foram centralizados nos estados de Minas Gerais (Virgem da Lapa), Paraíba e Piauí - áreas endêmicas tradicionais da doença de Chagas. A detecção de parasitos circulantes nos indivíduos soropositivos foi obtida por meio dos testes de xenodiagnóstico e amplificação pela reação de PCR (Borges-Pereira et al., 2002).

Em Virgem da Lapa, área com elevado índice de cardiopatia, a positividade da técnica de PCR foi de 95%, enquanto em Oeiras, Piauí, foi de 60% e no Sertão da Paraíba, área com baixo índice de cardiopatia e de megaesôfago, a positividade foi de 44%, indicando variações regionais nos níveis da parasitemia na fase crônica, assim como o xenodiagnóstico (Britto et al., 1995b). Em João Costa, Piauí, Borges et al (2002) confirmaram essas variações regionais na avaliação da positividade (74,5%) da técnica de PCR em indivíduos chagásicos crônicos. O ensaio de PCR também permitiu definir resultados duvidosos de sorologia, mostrando o potencial do teste molecular como um instrumento complementar de diagnóstico nos casos de indefinição dos testes sorológicos convencionais (Picka et al., 2007)

Pacientes submetidos ao tratamento específico representam um outro problema, para o qual se espera que novas técnicas de detecção possam trazer

soluções importantes. Atualmente, poucas drogas anti-*T. cruzi* estão disponíveis e a eficiência destas é questionável devido à ausência de um sistema confiável capaz de monitorar a eficácia de esquemas terapêuticos e o estabelecimento de critérios para o controle de cura dos pacientes. Como mencionado anteriormente, os métodos parasitológicos tradicionais de hemocultivo e xenodiagnóstico são laboriosos e de baixa sensibilidade, o que limitaria a sua utilização como critério de cura pós-tratamento. Em contrapartida, a sorologia convencional é particularmente ineficiente nestas situações, uma vez que, a maioria dos pacientes tratados continua a apresentar resposta humoral durante um longo período pós-tratamento, mesmo após a completa eliminação do parasito (Coura & Castro, 2002).

A abordagem molecular também foi usada para investigar a ausência do parasito, 20 anos após quimioterapia anti-*T. cruzi*. Indivíduos soropositivos e que apresentaram um xenodiagnóstico positivo (n=85), foram tratados com drogas específicas tanto na fase aguda (n = 37) quanto na fase crônica (n = 48) da infecção. O tratamento na fase aguda forneceu resultados negativos na reação de PCR em 73% dos casos, enquanto o xenodiagnóstico foi negativo em 86% dos indivíduos estudados. Em relação à fase crônica, a reação de PCR foi negativa em 65% dos pacientes e 83% destes demonstraram resultados de xenodiagnóstico negativos. Esses dados revelam a importância do ensaio molecular em confirmar falha terapêutica, possibilitando assim a alteração de esquemas quimioterápicos nos casos de resistência ou reativação da infecção pelo *T. cruzi*. Os autores sugeriram que a concordância dos resultados negativos entre a reação de PCR e a sorologia seria provavelmente indicativa de cura e ressaltaram o fato de que o desaparecimento de anticorpos da circulação é um processo extremamente lento, mesmo nos casos de sucesso terapêutico levando à total eliminação do parasito (Britto et al., 2001).

Em decorrência da variabilidade nos níveis de sensibilidade gerada pelos diferentes protocolos já descritos e levando-se em conta que a variabilidade depende não apenas das características epidemiológicas das populações estudadas, mas também do volume de sangue coletado, do método para extração de DNA, da escolha das seqüências de DNA-alvo e dos iniciadores, além dos reagentes e das condições de ciclagem térmica, há necessidade de que um estudo multicêntrico de padronização da técnica seja realizado, com o intuito de se estabelecer um protocolo de consenso para ser usado por todos os grupos que

realizam o teste molecular em sua rotina diagnóstica (Russomando et al., 1992; Wincker et al., 1994; Britto et al., 1995b; Gomes et al., 1998; Virreira et al., 2003).

Nas últimas décadas, a metodologia de detecção de genes e seqüências específicas foi aperfeiçoada com o desenvolvimento de diferentes sistemas de PCR em tempo-real, utilizando uma abordagem quantitativa automatizada baseada no emprego de sondas fluorogênicas ou corantes fluorescentes com afinidade à molécula de DNA, para a medida em tempo real da reação de amplificação. A implementação de um ensaio quantitativo capaz de estimar precisamente a carga parasitária de pacientes chagásicos e monitorar a parasitemia, poderá ser particularmente útil como um indicador de eficácia terapêutica (Piron et al., 2007).

A reação de PCR é freqüentemente utilizada em laboratórios de pesquisa, no entanto, ainda não se tornou disponível em laboratórios de rotina embora os casos com resultados duvidosos possam ser caracterizados por essa técnica (Ferreira & Ávila, 2001).

Uma grande vantagem do PCR é a obtenção de resultados em pouco tempo, ao contrário dos métodos parasitológicos indiretos, que apresentam seus resultados após semanas ou meses. Outras vantagens do PCR são a melhor flexibilidade com materiais em teste e a possibilidade de repetir os testes em caso de resultados duvidosos, devido à utilização de volumes pequenos do material clínico. Entretanto, as técnicas de PCR e hibridização usam reagentes e equipamentos dispendiosos e exigem treinamento especializado, além de espaço físico apropriado para evitar a contaminação das amostras (Picka et al., 2007).

### **1.8.3 - Diagnóstico Sorológico e Triagem**

O diagnóstico sorológico revela a presença de anticorpos específicos no soro do paciente, produzidos contra o parasito. A detecção destes anticorpos pode ser efetuada por diferentes técnicas que são, até o momento, as mais indicadas para o diagnóstico na fase crônica da doença, pois a memória imunológica se mantém apesar do pequeno número de parasitas circulantes.

A sorologia para a doença de Chagas começou a ser feita em 1913 com a reação de fixação do complemento, descrita por Guerreiro e Machado. Realizada com antígeno homólogo – extrato de formas de cultura do parasito sob diferentes preparações – este método apresenta muitos problemas, tais como, indicativos de reações cruzadas, o estabelecimento de pontos de corte, a dificuldade na realização

do teste e a baixa sensibilidade, que a tornaram uma técnica para ser utilizada apenas em pequenos laboratórios (Ferreira & Ávila, 2001).

O imunodiagnóstico fornece resultados rápidos, porém quando se utiliza extrato bruto do parasito observam-se problemas de especificidade, provenientes de reações cruzadas. Vários trabalhos descrevem esse tipo de ocorrência entre pacientes portadores de diferentes patologias, em testes para sorologia chagásica. Estas reações estão descritas para tripanosomíase provocada por *T. rangeli*, leishmaniose tegumentar e visceral, sífilis, toxoplasmose aguda, esquistossomose, artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, pênfigo foliáceo, paracoccidioomicose, hepatite e mononucleose (Carrasco et al., 1985).

A transfusão sangüínea assume relevante importância na epidemiologia da doença de Chagas, uma vez que corresponde a principal via de transmissão na zona urbana onde reside cerca de 70% da população das Américas (Schmunis et al.1998).

Com exceção dos derivados sangüíneos, que são submetidos durante o seu preparo a processos físico-químicos de esterilização, todos os componentes sangüíneos podem transmitir a infecção pelo *T. cruzi* (Bonametti et al.,1998).

Até a década de 80 muitos países endêmicos sequer discutiam a transmissão transfusional ou suspeitavam com clareza da sua ocorrência e desta forma, nenhum teste de triagem na seleção de doadores de sangue foi realizado para a doença de Chagas (Bonametti et al.,1998).

No Brasil, a obrigatoriedade do teste para doença de Chagas na seleção de candidatos à doação de sangue só ocorreu a partir da década de 80. Em 19 de novembro de 1993, foi publicada a portaria 1376 do Ministério da Saúde (MS), que estabelecia um regulamento técnico rigoroso para os serviços de hemoterapia no Brasil. Essa portaria determinava a realização de dois testes com princípios metodológicos diferentes para o diagnóstico do “mal” de Chagas em todos os doadores de sangue. Bolsas de sangue com resultado considerado reagente em pelo menos um dos testes utilizados eram excluídas (Ministério da Saúde, 1993).

Em vários países latino-americanos, como a Argentina, o Chile (somente em áreas endêmicas), Honduras, Paraguai, Uruguai, Venezuela e Equador também é obrigatória a sorologia para a tripanossomíase americana em candidatos a doação de sangue (Schmunis & Cruz, 2005).

Em 2002, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) revogou a referida portaria 1376 por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 343, de

13 de dezembro de 2002 (Ministério da Saúde, 2002), suspendendo a obrigatoriedade dos dois testes de princípios diferentes para a doença de Chagas, passando a vigorar a realização de apenas um teste imunoenzimático de alta sensibilidade na triagem dos doadores. Em 14 de Junho de 2004, a RDC 343 foi revogada passando a vigorar a RDC 153 que determina os mesmos procedimentos (Ministério da Saúde, 2004).

O combate sistemático ao vetor, a obrigatoriedade de triagem sorológica do doador de sangue e os programas de fidelização destes doadores pelos serviços de hemoterapia na maioria dos países latino-americanos, tem contribuído para a redução significativa da prevalência da infecção chagásica entre esses indivíduos e conseqüentemente do risco de transmissão da doença pela via transfusional de sangue e componentes. A ocorrência atual de reações sorológicas positivas para *T. cruzi* é de 0,6%, uma queda significativa se comparada ao índice de 7,0% verificado nos anos 70. Entretanto, em paralelo à diminuição de doadores chagásicos, tem-se observado uma alta proporção de resultados discrepantes ou indeterminados na triagem sorológica de bancos de sangue e tais resultados caracterizam-se por amostras duvidosas em um determinado teste e positivas ou mesmo negativas em outro (Souza et al., 2006).

Diante da evidência de que grande parte das reações indeterminadas representa falha na especificidade dos testes sorológicos, conseqüentemente muitos indivíduos sadios serão considerados como portadores de uma doença grave desencadeando problemas psicológicos, sociais e econômicos ao doador excluído, além de promover o descarte desnecessário de bolsas de sangue, gerando perdas financeiras ao SUS (Souza et al., 2006).

#### **1.8.3.1 - Teste Hemaglutinação Indireta (HAI)**

O teste de hemaglutinação indireta muito utilizado no passado e padronizado por Cerisola e cols (1962) se baseia na aglutinação de hemácias sensibilizadas com antígeno de *T. cruzi*, em presença de soro contendo anticorpos contra esse parasito. Sua utilização foi amplamente difundida em virtude da facilidade de execução do teste, rapidez na leitura e por dispensar a utilização de equipamentos adicionais para a realização do ensaio. O teste divide-se em 3 etapas. Inicialmente, adiciona-se a amostra, que, sendo reagente, contém anticorpos anti-*T. cruzi*. O suporte é uma placa de microtitulação com 96 cavidades. Em seguida, adicionam-se hemácias

sensibilizadas com antígeno de *T. cruzi*. A reação antígeno-anticorpo que ocorre na terceira etapa é detectada pela aglutinação das hemácias (Ministério da Saúde, 1998).

A leitura do teste é visual, com a placa de microtitulação colocada contra a luz ou em espelho próprio. A amostra é considerada reagente quando as hemácias estão distribuídas de maneira homogênea, em forma de tapete, ocupando área maior do que 50% do fundo da placa. Um resultado não reagente é observado quando as hemácias ficam acumuladas em forma de botão no fundo do poço; e uma amostra indeterminada é aquela que apresenta qualquer padrão diferente dos anteriores (Ministério da Saúde, 1998).

O teste de HAI pode ser qualitativo ou quantitativo. O teste de HAI qualitativo é utilizado para definir se uma amostra é reagente ou não reagente. Nesse caso a amostra é diluída apenas uma vez. O teste de HAI quantitativo é utilizado para confirmar os resultados das amostras reagentes no HAI qualitativo e para definir o título destas amostras. A titulação é feita com a diluição seriada do soro. Essa técnica tem sido amplamente utilizada para fins de rotina em virtude do baixo custo e simplicidade na sua execução. No entanto, reações cruzadas têm sido observadas com outras parasitoses, principalmente com leishmanioses. Além disso, a leitura é subjetiva o que concorre para falhas na interpretação dos resultados (Luquetti & Rassi, 2000).

#### **1.8.3.2 - Teste de Imunofluorescência Indireta**

A Imunofluorescência indireta (IFI) é um dos testes mais utilizados na sorologia da doença de Chagas (Camargo & Souza, 1966). A IFI é realizada com formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) formolizadas, fixadas em lâminas de vidro e incubadas com o soro do paciente diluído em tampão apropriado. Posteriormente, após lavagens sucessivas, as lâminas são incubadas com anticorpo antigama globulina humana conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (conjugado fluorescente). Após incubação e lavagens, a lâmina é analisada por microscopia de fluorescência, cuja luz ultravioleta ativa o isotiocianato de fluoresceína, presente apenas nos parasitos que apresentam anticorpos ligados à sua superfície. Na ausência de anticorpos, os parasitos permanecem com coloração avermelhada tênue. A interpretação dos resultados deve obedecer aos seguintes critérios (Luquetti & Rassi, 2000):

- amostra não reagente: Ausência total de fluorescência nos parasitos (Figura 1.5a).
- amostra reagente: presença de fluorescência uniforme em toda a membrana do tripanosoma (Figura 1.5b).
- amostra indeterminada: Qualquer padrão diferente dos descritos acima.

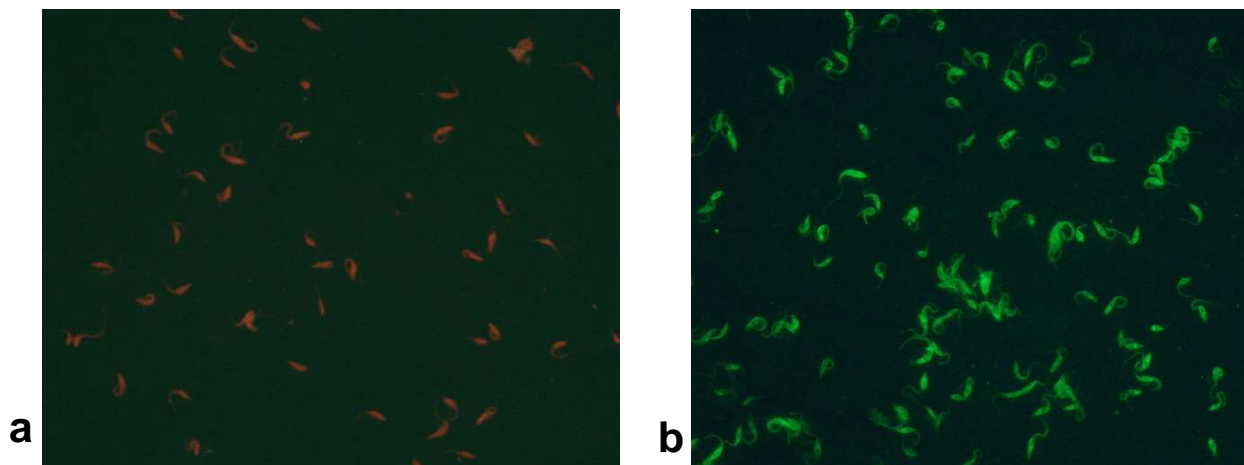


Figura 1.5 – a) IFI - Reação negativa b) IFI - Reação Positiva. Fotos gentilmente cedidas pelo LACORE (Laboratório de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos)

O ensaio de IFI para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* tem sido considerado como teste de referência na sorologia da doença de Chagas. A pesquisa de anticorpos Ig-M anti *T. cruzi* tem valor significativo no diagnóstico da doença aguda. Camargo e Amato-Neto (1974) utilizaram anticorpos específicos anti-IgM humano, para a detecção da fase aguda e da transmissão congênita da infecção. Hoje em dia, utiliza-se como conjugado anticorpo anti-Ig humano marcado com fluoresceína, uma vez que os fluorocromos podem ser conjugados às regiões Fc de uma molécula de anticorpo, sem afetar sua especificidade e, portanto mantendo a sua capacidade detectar tanto IgM quanto IgG (Ferreira & Ávila, 2001).

A leitura do teste é subjetiva, assim como no teste de HAI, devendo o equipamento de leitura estar bem ajustado para minimizar a ocorrência de erros técnicos. O amplo uso do teste de IFI se deve às seguintes vantagens: relativa facilidade de se obter reagentes padronizados, elevada sensibilidade associada a altos títulos de anticorpos em soros de população infectada e processamento de um grande número de amostras. No entanto, sua especificidade é baixa uma vez que permite a ocorrência de reações cruzadas com amostras de indivíduos com outras parasitoses (Luquetti & Rassi, 2000).

### 1.8.3.3 - Ensaio Imunoenzimático

O termo em inglês *Enzyme-linked Immunosorbent assay* (ELISA) ou em português Ensaio Imunoenzimático (EIE) foi utilizado por Engvall e Perlmann em 1971. Esse teste foi desenvolvido como uma alternativa ao radioimunoensaio, para a detecção de antígenos ou anticorpos e consistia em um ensaio heterogêneo, diferente dos métodos enzimáticos até então utilizados que envolviam colorações imuno-histoquímicas pela técnica de imunoperoxidase. (Sanchez, 2001).

Voller e cols. (1975) descreveram o teste EIE para o diagnóstico da doença de Chagas utilizando placas de microtitulação sensibilizadas com componentes antigênicos solúveis de formas epimastigotas de *T. cruzi* previamente adsorvidos.

O princípio do EIE baseia-se em uma reação imunológica (antígeno-anticorpo) seguida de uma etapa com antígeno ou anticorpo conjugado a uma enzima, um substrato e uma substância reveladora. Deste modo, antígenos ou anticorpos primários são adsorvidos a uma fase sólida, usualmente uma placa de poliestireno de 96 poços. Em seguida, a superfície é lavada com uma solução tampão de bloqueio para impedir que proteínas não específicas adsorvam nessas superfícies. Posteriormente, a amostra que pode conter antígeno ou anticorpo dependendo do método empregado é incubada e o anticorpo ou antígeno não ligado à amostra, é retirado por lavagem. À superfície da placa são adicionados anticorpos ou antígenos ligados a uma enzima que na presença de um substrato e de uma solução cromógena desenvolvem cor. A intensidade da cor é proporcional à concentração do antígeno ou do anticorpo pesquisado, presente na amostra (Davis, 1990).

O Teste imunoenzimático pode ser apresentado em vários modelos:

1) EIE direto que funciona como um “sanduíche” montado da seguinte forma: anticorpo de captura – antígeno de interesse – anticorpo secundário conjugado com uma enzima, sendo a mais utilizada a enzima peroxidase.

2) EIE Indireto : O antígeno é aderido a fase sólida e se liga aos anticorpos presentes na amostra. A reação antígeno-anticorpo é detectada por meio da adição



de um conjugado anti-imunoglobulina humana ligado a uma enzima. A reação é evidenciada após a adição de um substrato que é oxidado pela enzima, originando um produto com cor (Ministério da Saúde, 1997).

3) EIE competitivo : O antígeno é aderido a fase sólida em seguida adiciona-se a amostra (contendo ou não os anticorpos) e o conjugado (anticorpo específico que irá se ligar ao antígeno idêntico ao da amostra à enzima). Os anticorpos presentes na amostra irão competir com o conjugado impedindo a ligação deste. Nesse caso, em uma reação positiva não se observa cor (o substrato não será oxidado pois a enzima não está presente) e na reação negativa observa-se oposto (Ministério da Saúde, 1997).

No teste EIE o resultado é definido pela leitura da absorvância ou densidade óptica (DO) em espectrofotômetro, utilizando um filtro com comprimento de onda indicado pelo fabricante, de acordo com a cor do produto formado pela oxidação do substrato pela enzima. Cada conjunto de diagnóstico possui uma fórmula para calcular o *cut-off* (CO), ou seja, o ponto de corte, acima ou abaixo do qual as amostras são consideradas reagentes, não reagentes ou indeterminadas. As amostras indeterminadas são aquelas cujos valores de DO estão incluídos na zona cinza (*borderline*). A zona cinza varia com o fabricante do kit e pode compreender valores superiores e inferiores ao CO, em torno de 10% (Luquetti & Rassi, 2000).

Algumas das vantagens do EIE são a elevada sensibilidade, a utilização de pequenas quantidades de soro ou plasma, o processamento de várias amostras em uma só placa, a utilização de espectrofotômetros portáteis para a leitura dos resultados no campo, com leitura objetiva e possibilidade de automação (Figuras 1.6a e 1.6b). Por outro lado, a especificidade está longe do ideal quando antígenos brutos ou semi-purificados são utilizados, principalmente pela ocorrência frequente de resultados *borderline*. O uso de frações ou antígenos purificados de *T. cruzi* fornece resultados promissores para minimizar a reatividade cruzada e aumentar a especificidade para soros chagásicos (Gomes, 1996).



Figura 1.6- a) Teste de EIE – Sistemas de automação e b) Teste de EIE - Microplaca (Silva, 2003).

O desempenho dos diferentes conjuntos de EIE para o diagnóstico da doença de Chagas (EIE) existentes no mercado foi avaliado observando-se valores de sensibilidade de 97,7% a 100% e de especificidade entre 93,3% e 100%, sendo constante nos diferentes conjuntos, os níveis de sensibilidade, porém com especificidade variável. (Oelemann et al.,1998).

Mais recentemente, outro estudo foi realizado para avaliar o desempenho de vários *kits* (n=12) de onze fabricantes, com registro na ANVISA, incluindo Bio-Manguinhos/FIOCRUZ para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas. Os resultados indicaram que os níveis de sensibilidade variaram de 97% a 100% e os de especificidade de 60% a 100%. Diante disto, a Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, levando-se em conta o intervalo de confiança (IC) de 95%, recomendou, aos laboratórios que realizam o diagnóstico da doença de Chagas, a utilização de um *kit* que apresente sensibilidade maior ou igual a 99% e especificidade maior ou igual a 97% (Ministério da Saúde, 2006a).

### 1.8.3.4 – Testes sorológicos – Antígenos em uso

#### 1.8.3.4.1 - Antígenos purificados

Na década de 80 surgiram vários antígenos com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade dos testes. Os antígenos purificados GP90 kDa presentes na superfície de todos os estágios evolutivos do *T. cruzi* (Scott & Snary, 1982) e GP97-83 presente nos estágios amastigota e epimastigota (Pan & Pratt, 1989) foram usados em pesquisa com bons resultados, elevando a especificidade das reações. No entanto, não foram incluídos em conjuntos diagnósticos por motivos econômicos e técnicos. A purificação e produção de antígenos do parasito por meio da bioquímica clássica é uma tarefa laboriosa, e apenas pequenas quantidades dos componentes antigênicos podem ser obtidas.

#### 1.8.3.4.2 - Antígenos excretados e secretados

A descoberta de vários antígenos secretados e excretados da forma tripomastigota de *T. cruzi*, liberados espontaneamente no sobrenadante de cultura de células infectadas, têm levado à muitas pesquisas para sua aplicação, como alvo para novos métodos de diagnóstico sorológico devido a sua alta sensibilidade (Affranchino et al., 1989).

Antígenos secretados e excretados no sobrenadante de cultura de células LLC-MK2 infectadas por formas tripomastigostas da cepa Y de *T. cruzi* foram caracterizados e denominados TESA (*tripomastigote excreted and secreted antigen*). Esses antígenos foram usados em uma reação de *immunoblotting*, chamada de TESAblot para testar amostras de sangue de pacientes chagásicos das formas clínicas, congênita, aguda e crônica e não chagásicos (Umezawa et al., 1996). Os autores encontraram valores de 100% sensibilidade e especificidade e demonstraram por meio do teste que os soros de pacientes crônicos e agudos reconheciam componentes antigênicos localizados em diferentes regiões na fita de nitrocelulose.

Devido as limitações apresentadas no TESAblot com relação à sua aplicação em grandes rotinas, um novo método denominado TESAELISA foi proposto na plataforma EIE. O ensaio apresentou alta sensibilidade em soros de pacientes tanto na forma crônica como na forma aguda da doença. No entanto, a especificidade foi

limitada devido à ocorrência de reações cruzadas em amostras de indivíduos com leishmaniose (Umezawa et al., 2003).

#### 1.8.3.4.3 - Antígenos recombinantes

Na última década, com o desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante, os problemas relacionados à purificação de proteínas pela bioquímica clássica foram superados. Com a tecnologia de DNA recombinante, tornou-se possível a expressão e produção em bactérias, ou em outro microrganismo conveniente, de proteínas heterólogas. O procedimento básico consiste em introduzir em bactérias o material genético (DNA) de outro organismo de tal forma que as bactérias agora transformadas processarão esse DNA como o seu próprio material genético. Desta maneira, a partir do DNA exógeno introduzido nas bactérias, serão produzidas proteínas recombinantes (Scherf et al., 1990).

Por meio de manipulações adequadas as bactérias foram transformadas com o material genético do *T. cruzi*, sendo gerada uma biblioteca de genes do parasito obtendo-se clones de bactérias expressando diferentes genes desse parasito. A biblioteca foi analisada, através do uso de técnicas imunológicas apropriadas, com soro de pacientes chagásicos, de tal forma que foram detectados diversos clones de bactérias que estavam produzindo proteínas do *T. cruzi* e que foram reconhecidas pelo soro dos pacientes chagásicos (Lafaille et al., 1989).

Após a análise individual desses clones frente a sua reatividade com soros negativos e positivos para a doença de Chagas, dois clones expressando proteínas do *T. cruzi* com elevado valor de diagnóstico foram isolados. O estudo posterior destes genes revelou que ambos apresentavam uma estrutura onde havia a repetição de um mesmo motivo (epítipo) reconhecido por anticorpo. Um dos antígenos apresentava uma localização difusa no citoplasma enquanto o outro era flagelar. Em função de sua estrutura em epitopos repetitivos e sua localização, esses antígenos foram denominados de antígeno citoplasmático repetitivo ou *cytoplasmic repetitive antigen* (CRA) e está presente nas formas epimastigotas e amastigotas, e antígeno flagelar repetitivo ou *flagelar repetitive antigen* (FRA), presente nas formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* (Lafaille et al., 1989).

O desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante (Scherf et al., 1990) permitiu a seleção e clonagem de genes de vários antígenos parasitários, alguns destes com grande potencial de utilização no diagnóstico imunológico da doença de

Chagas (Krieger et al.,1992; Umezawa & Silveira,1999; Silveira et al., 2001; Gomes et al., 2001; Umezawa et al., 2003).

O desempenho de diferentes misturas de antígenos recombinantes foi também avaliado em outros estudos. O imunoenensaio em linha (INNO-LIA®Chagas Ab) utiliza em sua composição uma mistura de sete antígenos recombinantes TC24, SAPA, MAP(microtubule-associated protein), TcD, AG39, inclusive CRA e FRA . O ensaio Immunodot (Dia Kit Bio-Chagas assay ®) foi desenvolvido com a mistura de cinco antígenos recombinantes AG1,AG2, AG13, AG30 e SAPA (Shed acute phase antigen). As proteínas B13, 1F8 e H49 foram utilizadas em um ensaioimunoenzimático (Mix-ELISA) e o ensaio quimioluminescente (PRISMChagas) que utiliza quatro proteínas recombinantes quiméricas onde todos apresentaram sensibilidade mínima de 99,6% e especificidade mínima de 99,1% (Silveira et al., 2001; Umezawa et al., 2003; Chang et al., 2006).

#### **1.8.3.5 - O Kít EIE Recombinante chagas – Bio-Manguinhos**

Uma alternativa promissora ao diagnóstico da doença de Chagas utilizando antígenos recombinantes naturais do *T. cruzi*, CRA e FRA, foi obtida a partir de um trabalho de colaboração entre as áreas de pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e de produção do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), ambas Unidades Técnicas da FIOCRUZ.

Este trabalho teve início em 1987, no Laboratório de Expressão Gênica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), onde foram selecionadas as duas proteínas, CRA e FRA (Lafaille et al., 1989; Krieger et al., 1990), com elevada reatividade para anticorpos anti-*T. cruzi* na plataforma de teste imunoenzimático. A seleção destes antígenos baseou-se na análise da reatividade de diferentes proteínas recombinantes frente a diversos soros chagásicos. As proteínas CRA e FRA foram escolhidas por apresentarem cerca de 95% de concordância com os resultados da sorologia tradicional. Resultados promissores foram obtidos quando se efetuou a mistura dos dois antígenos e neste caso, soros que não reconheciam as proteínas isoladamente passaram a apresentar reatividade para a mistura CRA e FRA (Almeida et al.,1990).

Classicamente, nos ensaios imunoenzimáticos, utiliza-se para revelação do imunocomplexo uma molécula de alta afinidade ao anticorpo primário, em geral um outro anticorpo associado a uma atividade enzimática. De acordo com uma inovação

proposta por Krieger et al (1992), a revelação do imunocomplexo é efetuada pela própria mistura antigênica associada a uma enzima. Neste caso, o mesmo anticorpo deve se ligar à mistura dos dois antígenos impregnados no suporte físico (método direto) na qual ocorre reação imunológica e aos antígenos conjugados a atividade enzimática, utilizados para a revelação do teste (Figura 1.7). Com esta técnica foi possível a utilização de soros brutos (sem diluição), favorecendo o reconhecimento das proteínas, por amostras com baixo título de anticorpos, uma vez que só os anticorpos específicos para os antígenos utilizados no teste são detectados.

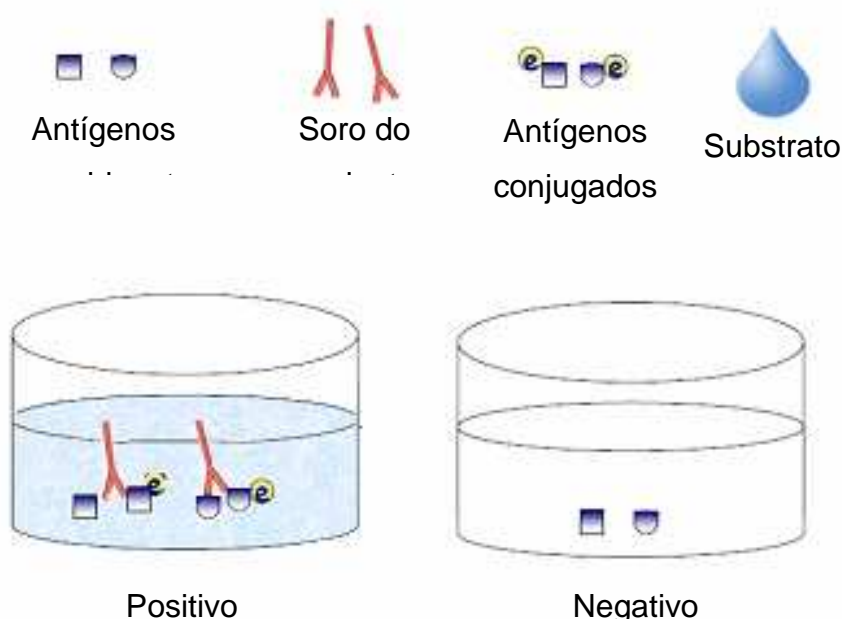


Figura 1.7 – EIE direto - Representação esquemática

No método original, as proteínas CRA e FRA fusionadas a  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) foram impregnadas na fase sólida. Para a conjugação com a peroxidase havia a necessidade de retirar a  $\beta$ -gal, devido a reatividade cruzada desta enzima em um elevado percentual de indivíduos sadios, inviabilizando a padronização de um teste com especificidade em níveis aceitáveis. Esta dificuldade foi contornada por meio da expressão dos antígenos CRA e FRA fusionados a  $\beta$ -gal nos plasmídeos pMS-gt11. Este novo vetor permitiu a separação da porção  $\beta$ -gal da cadeia polipeptídica relativa a CRA/FRA por meio de clivagem enzimática de um segmento de ligação entre  $\beta$ -gal e a proteína recombinante utilizando-se o fator Xa (Krieger et al.,1992; Scherf et al.,1990). A inclusão da etapa de separação da proteína recombinante da  $\beta$ -gal com o fator Xa, inviabilizou na época o escalonamento da produção do kit. Apesar deste processo se mostrar eficiente na obtenção de elevados índices de sensibilidade e especificidade do kit, o rendimento do produto de clivagem era baixo

e trazia como inconveniente a necessidade de inclusão de uma etapa de purificação para a retirada do estabilizante da proteína soroalbumina bovina (BSA). Além destes, outros inconvenientes se somavam como o alto custo da enzima, o processo de importação demorado e o prazo de validade curto (Silva, 2003).

Uma nova estratégia de obtenção das proteínas recombinantes CRA e FRA foi concebida utilizando-se os dois antígenos juntos fusionados a *Glutathione-S-Transferase* (GST). A obtenção desta nova construção permitiu um redesenho do teste com a eliminação da fase de clivagem da  $\beta$ -gal, o que conseqüentemente viabilizou a produção deste ensaio para diagnóstico. Esta nova formatação do teste utilizou como fase sólida a construção GST fusionada a proteína CRA&FRA (GST-CRA&FRA) e para a conjugação com a enzima peroxidase foram utilizadas as proteínas recombinantes CRA e FRA fusionadas a  $\beta$ -gal (Figura 1.8). Com o uso dessa construção no conjugado não haveria problema de reação cruzada com anticorpos anti-  $\beta$ -gal (Silva, 2003).

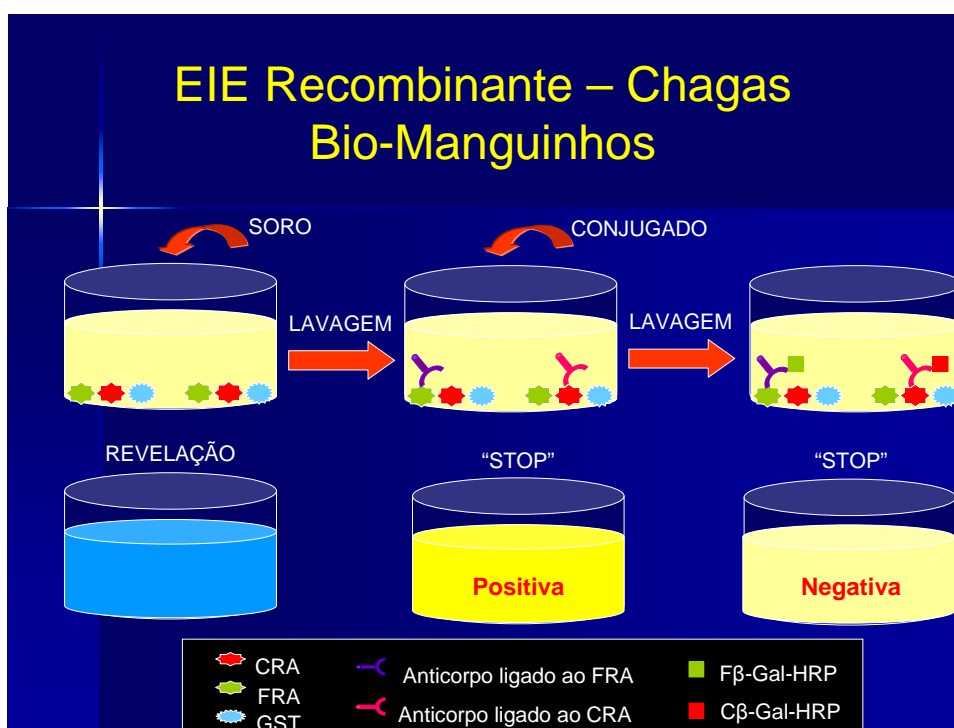


Figura 1.8 – Representação esquemática do modelo do EIE recombinante Chagas, Bio-Manguinhos (Silva, 2003).

O potencial de utilização deste EIE CRA e FRA direto foi avaliado em dois estudos independentes, sendo um deles patrocinado pela OMS e que consistia na comparação do desempenho sorológico de diferentes testes em desenvolvimento para o diagnóstico da doença de Chagas. Entre os mais de trinta testes avaliados de todo o mundo, oito apresentaram desempenho considerado altamente satisfatório e dos oito somente o realizado com o antígeno CRA obteve 100% de especificidade e sensibilidade (Moncayo & Luquetti, 1990; Silveira, 2001).

O segundo estudo foi efetuado em colaboração com a Fundação Hemocentro de São Paulo, maior banco de sangue da América Latina, para análise do desempenho de testes considerados padrões para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, a saber, hemaglutinação, imunofluorescência indireta, cinco testes de EIE disponíveis comercialmente e o EIE recombinante CRA+FRA. Os resultados obtidos mostraram que o EIE recombinante CRA+FRA apresentou maior especificidade e maior valor preditivo positivo em relação aos Kits testados e 98% de sensibilidade. Nesse estudo foi avaliado um total de 582 amostras de soros, sendo 144 provenientes de um painel de soros de área endêmica para a doença de Chagas, 380 provenientes da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo e 58 pacientes com outras patologias. Nenhuma destas últimas (n=58) reagiu cruzadamente no EIE recombinante CRA+FRA (Carvalho et al., 1993).

Durante o estudo de padronização o kit também foi submetido à avaliação de 438 amostras de soros e plasmas humanos, sendo 171 positivas, 209 negativas e 58 negativas para doença de Chagas, porém positivas para outras patologias passíveis de apresentarem reatividade cruzada, envolvendo pacientes de áreas endêmicas e não endêmicas, além de doadores de sangue. Os resultados obtidos foram de 98,3% de sensibilidade e 100% de especificidade, considerando a concordância com outros ensaios laboratoriais, a saber, EIE, IFI e HAI, além de xenodiagnóstico positivo de 60 destas amostras (Silva, 2003).

Bio-Manguinhos registrou o produto EIE Recombinante Chagas na ANVISA pelo período de 27/08/1999 a 27/08/2004 cumprindo as exigências da Portaria nº08/MS/SVN (MS, 1996), vigente à época e que dispunha sobre o tema.

## **1.9 - Racional**

Bio-Manguinhos, Unidade de Pesquisa e Produção da Fundação Oswaldo Cruz, ligada ao Ministério da Saúde, tem como missão o atendimento de demandas



em Saúde Pública em três linhas de produtos: vacinas, reativos para diagnóstico e biofármacos.

A produção de reativos para diagnóstico teve início há mais de 15 anos e têm como principais alvos as seguintes doenças: HIV/aids, leishmaniose, leptospirose, dengue, doença de Chagas, malária, hepatites virais, entre outros. Os diversos conjuntos de diagnóstico foram desenvolvidos em diferentes plataformas e constituem testes rápidos, ensaios moleculares, sorológicos de imunofluorescência indireta e imunoenzimáticos.

O Kit EIE Recombinante Chagas Bio-Manguinhos, por ocasião da renovação do registro para comercialização do produto, necessitava passar por uma análise prévia no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), FIOCRUZ. O reativo não alcançou condição satisfatória com relação aos níveis de sensibilidade nessa avaliação. Conseqüentemente, o seu registro não foi renovado e a produção foi paralisada, tendo o produto retornado aos cuidados do grupo de desenvolvimento tecnológico do Departamento de Reativos para Diagnóstico.

Diante da necessidade do mercado brasileiro, de testes com alto grau de sensibilidade, mas, sobretudo com alto grau de especificidade, para a doença de Chagas, visando minimizar a ocorrência de resultados falso-positivos tanto nos serviços de hemoterapia, como nos Laboratórios da Rede Pública, o kit EIE Recombinante Chagas Bio-Manguinhos tornou-se um produto estratégico para Bio-Manguinhos, com eficiência reconhecida pela comunidade científica (Carvalho et al., 1993; Gomes et al., 2001; Silveira et al., 2001; Gadelha et al., 2003; Silva, 2003). Segundo Gomes e colaboradores (2001) o mencionado conjunto de diagnóstico agrega algumas vantagens, como a utilização de amostras de soro que não precisam ser diluídas, reduzindo a possibilidade de erro na manipulação e o procedimento rápido, em média 2 horas, de fácil execução.

Visando dar continuidade ao trabalho de desenvolvimento tecnológico desse produto, procuramos padronizar alguns modelos de protótipos utilizando as construções dos antígenos recombinantes CRA e FRA fusionados à GST e a peptídeos (cauda de histidina), pretendendo alcançar melhorias significativas no que tange aos níveis de sensibilidade sem contudo alterar os níveis de especificidade já alcançados anteriormente pelo produto.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo geral**

Padronizar e avaliar o desempenho técnico do kit EIE Recombinante Chagas-Bio-Manguinhos, utilizando as construções recombinantes CRA&FRA-GST e CRA&FRA-HIS, objetivando encontrar um modelo com maior nível de sensibilidade, sem alterar a especificidade do teste, de modo a permitir a continuidade de sua produção e a utilização na rede de serviços de hemoterapia e de laboratórios do país.

### **2.2 – Objetivos específicos**

**2.2.1** – Cultivar, expressar e purificar os antígenos recombinantes CRA e FRA fusionados as proteínas GST,  $\beta$ -gal e Histidina.

**2.2.2** – Conjugar as proteínas recombinantes Histidina-CRA&FRA,  $\beta$ -gal-CRA e  $\beta$ -gal-FRA.

**2.2.3** – Padronizar três protótipos do kit.

**2.2.4** – Realizar em diferentes fases, análises do desempenho dos protótipos.

**2.2.5** – Determinar os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de cada protótipo.

## **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 – Locais de experimentação e procedimentos**

Os experimentos do presente estudo foram realizados em Bio-Manguinhos, no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), em colaboração com o Departamento de Reativos para Diagnóstico (DERED) de Bio-Manguinhos.

Os lotesementes das bactérias transformadas foram cultivados em uma área específica do LATED reservada para o cultivo de organismos geneticamente modificados. Foram seguidas as recomendações da Comissão Técnica de Biossegurança da Fiocruz, com o microorganismo utilizado no presente trabalho enquadrado na classe NB2 e manipulado de acordo com o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) nº 110/09.

Os meios e soluções formulados foram preparados pelo Setor de Soluções e Diluentes (SESOD) do DERED, seguindo as normas de controle de qualidade já estabelecidas pela Instituição.

Instalações e equipamentos foram certificados, calibrados e aprovados para uso em laboratório, de acordo com as normas de qualidade do Laboratório de Metrologia e Validação do Departamento de Garantia da Qualidade de Bio-Manguinhos (LAMEV/ DEGAQ).

Os antissoros obtidos em coelho, anti-CRA e anti-FRA, utilizados no presente estudo foram preparados de acordo com Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs) estabelecidos pela Seção de Insumos, Conjugados e Apoio (SEICA) do DERED, DI nº 1436 e pelo Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN), com protocolo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) nº PO151/02.

As proteínas recombinantes foram purificadas no LATED em colaboração com o Laboratório de Macromoléculas de Bio-Manguinhos (LAMAM).

Parte desse material foi conjugado à peroxidase de acordo com POP, previamente estabelecido pelo SEICA, DI nº 1440, no LATED. As soluções utilizadas na padronização dos protótipos foram elaboradas de acordo com POPs previamente estabelecidos pelo SESOD, a saber: Tampão Carbonato/Bicarbonato 0,01M ou Tampão de Sensibilização DI nº 2061, Tampão de Lavagem ou PBS-Tween DI nº 2064, Tampão Diluente do Substrato DI nº 2052, Solução de Substrato DI nº 2051, Solução de Cromógeno DI nº 2054 e Solução de Ácido Sulfúrico DI nº 2055, que estão dispostas no anexo 8.1.

## 3.2 - Produção das proteínas recombinantes

### 3.2.1 – Microorganismo Transformado

Foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) cepa XL1 – blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*<sup>-</sup>, F'[*proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup>  $\Delta$ M15, *Tn10*(*tet*<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>) transformadas geneticamente, para a produção das proteínas recombinantes, Histidina-CRA&FRA, GST-CRA&FRA,  $\beta$ gal-CRA e  $\beta$ gal-FRA. As bactérias foram mantidas em estoque de lotes devidamente registrados e armazenados em nitrogênio líquido aos cuidados do LATED e criopreservados a -70°C.

Todo o processo de transformação das bactérias com as proteínas de interesse, CRA e FRA, foi realizado pelo Laboratório de Expressão Gênica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do IOC em colaboração com Bio-Manguinhos. Este trabalho foi desenvolvido desde a década de 90, quando construções foram disponibilizadas para a utilização na padronização de um conjunto de diagnóstico da doença de Chagas. Foram disponibilizadas oito construções ao longo do tempo, a saber:  $\beta$ -gal-CRA,  $\beta$ -gal-FRA, GST-CRA, GST-FRA, GST-CRA&FRA, Histidina-CRA, Histidina-FRA e Histidina-CRA&FRA. As construções utilizando as proteínas recombinantes CRA e FRA fusionadas a peptídeos foram desenvolvidas mais recentemente e disponibilizadas para Bio-Manguinhos, não sendo utilizadas anteriormente na padronização do kit EIE-RecombinanteChagas-Bio-Manguinhos.

O vetor plasmidial da construção  $\beta$ -gal-CRA e  $\beta$ -gal-FRA é o plasmídeo pMSgT11 que expressa em *E. coli* as proteínas CRA e FRA fusionadas a proteína  $\beta$ -

gal. O vetor plasmidial da construção GST-CRA&FRA é o plasmídeo pGEX-A que expressa em *E. coli* as proteínas CRA&FRA (quimera) fusionadas a proteína GST. O vetor plasmidial da construção Histidina-CRA&FRA é o plasmídeo pQE-30 que expressa em *E. coli* as proteínas CRA&FRA fusionadas à seis resíduos do aminoácido histidina.

### 3.2.2 - Lotessementes

Os lotessementes das cepas de *E. coli* contendo as diferentes construções das proteínas CRA e FRA foram produzidos inoculando-se 200 mL de meio LB enriquecido com 2 mL de suspensão de células previamente cultivadas no mesmo meio, adicionado de ampicilina (Sigma) 100ug/mL, em frasco Erlenmeyer de 1000 mL. As culturas foram incubadas em agitador termoestabilizado (Lab Line), sob leve agitação a 37°C, até que as densidades óticas atingissem, a 600 nm, valor igual a 2. As massas celulares foram recuperadas por centrifugação a 6000 g por 20 minutos, ressuspensas volume a volume (v/v) em meio de cultivo LB ampicilina com glicerol a 96% (Invitrogen). Estas suspensões foram distribuídas em alíquotas e estocadas em freezer -70°C e em nitrogênio líquido

### 3.2.3 - Cultivo e Indução da bactéria transformada

Para a produção das massas de bactérias expressando as proteínas recombinantes  $\beta$ -gal-CRA,  $\beta$ -gal-FRA, GST-CRA&FRA e Histidina-CRA&FRA foram distribuídas em Erlenmeyer de 3000 mL contendo 500 mL de meio LB (enriquecido) acrescido de 2 mL de solução de ampicilina 25 mg/mL, além de 50 mL de um pré-inóculo com 18 horas de crescimento, oriundo do lote semente, como descrito no item anterior (3.2.2). As culturas foram incubadas a 37°C em agitador orbital, sob leve agitação, até que as densidades óticas a 600 nm atingissem 0,450 quando foi adicionada uma solução de iso-propyl $\beta$ -thiogalactosidase (IPTG), para uma concentração final de 0,1 mM, em cada frasco. Os cultivos foram monitorados, retirando-se alíquotas a intervalos de 30 minutos até que as densidades óticas a 600 nm se estabilizassem. Estas alíquotas foram armazenadas para posterior análise por eletroforese desnaturante descontínua em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) no

equipamento *phastsystem* (PHARMACIA), para verificação dos níveis de indução alcançados (Schägger & Jagow, 1987).

### 3.2.4 - Rompimento das células bacterianas

Após o cultivo e indução, a suspensão bacteriana transformada foi transferida para frascos previamente pesados e centrifugadas (Presvac) a 6000g por 20 minutos a 4°C. O *pellet* bacteriano foi ressuspenso em solução tampão Tris-HCl, 50mM, pH 8.0 contendo PMSF 1mM e Lisozima 5mM (1g de massa celular úmida/10mL de solução do tampão de lise). O rompimento celular foi realizado em um sonicador Branson Sonifier (Labline) 450, usando-se 2 pulsos de ultra-som, durante 2 minutos, com intervalo de 5 minutos entre eles e banho de gelo. O material rompido foi centrifugado a 6000g por 20 minutos a 4°C para retirada dos restos celulares e o sobrenadante armazenado em freezer – 20°C até a sua utilização.

### 3.3 - Purificação das proteínas recombinantes

Após diálise, os sobrenadantes das culturas lisadas foram submetidos à cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC-Ni) no caso dos recombinantes com cauda de histidina ou a cromatografia de afinidade por glutationa, no caso dos recombinantes com GST. Para as proteínas  $\beta$ -gal-CRA e  $\beta$ -gal-FRA a purificação constituiu de duas etapas: a primeira, por cromatografia de troca aniônica e a segunda por cromatografia de exclusão molecular.

#### 3.3.1 - Cromatografia de Afinidade

O sobrenadante de cultura lisada contendo o produto recombinante GST-CRA&FRA foi descongelado e centrifugado 6000g por 20 minutos a 4°C. A resina Glutaciona Sepharose (Sigma) foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. O sobrenadante foi adicionado a igual volume da resina em tubo de polipropileno de 50 mL e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos, com agitação suave. Em seguida, foram feitas lavagens sucessivas com tampão Tris-HCl 50 mM/ NaCl 150 mM pH 8 até a completa retirada do material não ligado à resina. A proteína foi eluída em 3 etapas, com incubação durante 5 minutos à temperatura

ambiente com agitação suave, utilizando-se uma solução Tris-HCl 50 mM com 10mM de Glutathione reduzida (Sigma), em cada etapa. As frações eluídas foram analisadas por eletroforese desnaturante em gradiente de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8-25%) no equipamento *phastsystem* e preparado um pool destas frações. A massa foi estimada pelo método de Folin-Lowry modificado (Bio-Rad), utilizando-se BSA (Cultlab) 1mg/mL como padrão (Peterson, 1983).

Quanto ao produto recombinante Histidina-CRA&FRA o sobrenadante de cultura lisada foi descongelado e centrifugado a 6000g por 20 minutos a 4°C. A resina Ni-NTA (Quiagen) foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM/ NaCl 300 mM/ Imidazol (Sigma) 20 mM pH 8 e, a esta, foram adicionados dois terços do sobrenadante de cultura em tubo de polipropileno de 50 mL, seguido de incubação à temperatura ambiente por 30 minutos, sob agitação suave. Em seguida, foram feitas lavagens sucessivas com tampão Tris-HCl 50 mM/ NaCl 300 mM/ Imidazol 20 mM pH 8 até a completa retirada do material não ligado à resina. A proteína foi eluída em 3 etapas com incubação por 15 minutos a temperatura ambiente sob agitação suave, utilizando-se uma solução de tampão Tris-HCl 50 mM/ NaCl 300 mM/ Imidazol 250 mM pH 8 em cada etapa. As frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE em gel gradiente de 8-25% no equipamento *phastsystem* e preparado um pool destas frações. Posteriormente o *pool* de eluídos foi submetido a uma dessalinização em coluna pré-empacotada com a resina sephadex G25 fine (Amershan), equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Esta etapa cromatográfica foi efetuada em estação de trabalho da Pharmacia Biotech (HPLC/FPLC). As amostras protéicas foram detectadas a 220 nm e 280 nm, sendo o gradiente salino monitorado por meio de condutivímetro específico. Após a dessalinização a amostra foi submetida à liofilização e sua massa foi estimada pelo método de Folin-Lowry modificado, utilizando-se BSA 1mg/mL como padrão (Peterson, 1983).

### **3.3.2 - Cromatografia de Troca Aniônica e Exclusão Molecular**

Os sobrenadantes das culturas lisadas contendo os produtos recombinantes  $\beta$ -gal-CRA e  $\beta$ -gal-FRA, foram descongelados e centrifugados 6000g por 20 minutos a 4°C. A cromatografia foi realizada em coluna Poros HQ (Applied Biosystems) de 100 mL com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8, utilizado para a lavagem da mesma. A cromatografia foi realizada por meio de gradiente salino em degrau *step wise*,

seguida pela eluição dos recombinantes  $\beta$ -gal-CRA e  $\beta$ -gal-FRA em 40% do tampão Tris-HCl 50 mM/ NaCl 1M pH8. Esta etapa foi efetuada em estação de trabalho da Pharmacia Biotech (HPLC/FPLC). As amostras protéicas foram detectadas a 220 nm e 280 nm, sendo o gradiente salino monitorado por meio de condutivímetro específico. As frações eluídas foram reunidas, concentradas e analisadas por SDS-PAGE 7,5% no sistema mini-protean (Bio-Rad). A concentração protéica foi estimada pelo método de Folin-Lowry modificado, utilizando-se BSA 1mg/mL, como padrão (Peterson, 1983).

As amostras concentradas foram aplicadas em cromatografia de exclusão e peneiração molecular, usando-se coluna sephadex 200 HR10/30 e foi usado para a eluição da coluna, o tampão Tris-HCl 50 mM/ NaCl 150mM pH 8. As frações eluídas foram reunidas, concentradas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE em (7,5%) no sistema mini-protean (Bio-Rad). A concentração protéica foi estimada pelo método de Folin-Lowry modificado, utilizando-se BSA 1mg/mL, como padrão (Peterson, 1983).

### **3.4 - Conjugação**

#### **3.4.1 - Conjugação da proteína recombinante Histidina-CRA&FRA**

Após as etapas de purificação, a proteína recombinante Histidina-CRA&FRA foi dialisada em tampão carbonato de sódio 0,01 mM pH 9,5 em colunas de gel filtração Sephadex G-25 do tipo PD 10 (Amersham Pharmacia) e sua concentração estimada em 2,3 mg/mL, pelo método de Folin-Lowry modificado, utilizando-se BSA 1mg/mL como padrão (Peterson, 1983). Inicialmente, dissolveu-se 1,15 mg de peroxidase (cerca de 50% do valor de massa de peroxidase Horseradish Type IV Sigma (HRP) em relação à concentração de proteína recombinante) em 1 mL de água, seguida da adição de 0,3 mL de metaperiodato 0,1M (Sigma) sob agitação constante por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a solução contendo peroxidase ativada foi dessalinizada em coluna Sephadex G-25 (PD10) e equilibrada com solução de acetato de sódio, 1mM, pH 4,4. Após desprezar um volume de 2,5 mL (equivalente ao volume de leito da coluna) coletou-se uma fração de 1,5 mL e posteriormente ajustou-se o pH desta fração para 9,5 utilizando-se tampão carbonato 0,2M, pH 9,5. A proteína recombinante Histidina-CRA&FRA, dialisada em tampão carbonato de sódio 0,01M, pH 9,5 (1 mL) foi conjugada à HRP



(Nakane e Kawoi, 1974) ativada por 2 horas sob agitação constante. Após este período foram acrescentados 0,15 mL de borohidrato de sódio (Sigma) a 0,1 M à preparação e em seguida, incubou-se a 4°C por 2 horas. Ao término deste período o conjugado foi passado em colunas de gel filtração Sephadex G-25 do tipo PD 10 (Amersham Pharmacia). Novamente, 2,5 mL (volume de leito da coluna) foram desprezados e coletada uma fração de 2 mL de conjugado, que foi estocada à -20°C até a definição do seu título no ensaio imunoenzimático de padronização dos protótipos.

### **3.4.2 - Conjugação da proteína recombinante $\beta$ -gal-CRA**

Após as etapas de purificação, a proteína recombinante  $\beta$ -gal-CRA foi dessalinizada em tampão carbonato de sódio 0,01 mM pH 9,5 em colunas de gel filtração Sephadex G-25 do tipo PD 10 (Amersham Pharmacia) e sua concentração estimada, em 0,99 mg/mL, pelo método de Folin-Lowry modificado, utilizando-se BSA 1mg/mL como padrão (Peterson, 1983). Inicialmente, dissolveu-se 5 mg de peroxidase em 1 mL de água e adicionou-se 0,25 mL de metaperiodato (0,1M) sob agitação constante por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a solução contendo a peroxidase ativada foi dessalinizada em coluna Sephadex G-25 (PD10) e equilibrada com solução de acetato de sódio, 1mM, pH 4,4. Após desprezar 2,5 mL (volume de leito da coluna) coletou-se 3,5 mL, fracionado em volumes de 0,5 mL e os tubos com coloração mais forte foram misturados e selecionados para o ajuste da concentração final de HRP ativada com a proteína a ser conjugada. O pH dessa solução foi ajustado para 9,5 utilizando-se tampão carbonato 0,2M, pH 9,5. Fez-se a leitura da solução de HRP ativada em espectrofotômetro (403 nm) para determinar sua concentração final.  $[HRP]=1.529 (D.O) \times 100 / 44 = 3,47 \text{ mg/mL}$ . Em seguida, foram retirados 0,144 mL desta solução para a conjugação com a proteína recombinante (3,5 mL), dialisada em tampão carbonato de sódio, por 2 horas, sob agitação constante. Após esse período foi acrescentado borohidrato de Sódio 0,1 M (0,0125 mL) à preparação e em seguida, incubou-se a 4°C por 2 horas. Ao término deste período o conjugado foi passado em colunas de gel filtração Sephadex G-25 do tipo PD 10 (Amersham Pharmacia). Um volume de 2,5 mL (volume do leito da coluna) foi desprezado e coletada uma fração de 1,5 mL de conjugado. Este conjugado foi estocado à -20°C, até a definição do seu título no ensaio imunoenzimático de padronização dos protótipos.

### 3.4.3 - Conjugação da proteína recombinante $\beta$ -gal-FRA

Após as etapas de purificação, a proteína recombinante  $\beta$ -gal-FRA foi dessalinizada em tampão carbonato de sódio 0,01 mM pH 9,5, usando-se colunas de gel filtração Sephadex G-25 do tipo PD 10 (Amersham Pharmacia) e sua concentração estimada em 1,1 mg/mL, pelo método de Folin-Lowry modificado, utilizando-se BSA 1mg/mL como padrão (Peterson, 1983). Inicialmente, dissolveu-se 5 mg de peroxidase em 1 mL de água e em seguida, adicionou-se 0,25 mL de metaperiodato (0,1M) sob agitação constante por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a solução contendo a peroxidase ativada foi dialisada em coluna Sephadex G-25 (PD10) e equilibrada com solução de acetato de sódio, 1mM, pH 4,4. Após desprezar, 2,5 mL (volume de leito da coluna) foram coletados 3,5 mL, fracionados em quantidades de 0,5 mL e os tubos com coloração mais forte foram selecionados e misturados para o ajuste da concentração final de HRP ativada com a proteína a ser conjugada. Posteriormente, o pH desta solução foi ajustado para 9,5 utilizando-se tampão carbonato 0,2M, pH 9,5. Fez-se então a leitura da solução de HRP ativada em espectrofotômetro (403 nm) para determinar sua concentração final.  $[HRP]=1,824 (D.O) \times 100/44=4,14$  mg/mL. Em seguida, retirou-se 0,133 mL desta solução para a conjugação com a proteína recombinante (volume: 2 mL) que foi dialisada em tampão carbonato de sódio 0,01 mM pH 9,5 e deixada por 2 horas sob agitação constante. Após esse período foi acrescentado borohidrato de Sódio 0,1 M (0,014 mL) à preparação e em seguida, incubou-se a 4°C por 2 horas. Ao término desse período o conjugado foi passado em colunas de gel filtração Sephadex G-25 do tipo PD 10 (Amersham Pharmacia). Após desprezar 2,5 mL (volume de leito da coluna) foi coletada uma fração de 1,5 mL de conjugado, que foi estocada a -20°C até a definição do seu título no ensaio imunoenzimático de padronização dos protótipos.

### 3.5 - Padronização dos protótipos

Do ponto de vista científico teríamos dezenas de possibilidades de formatação dos protótipos em função das oito construções disponibilizadas. No entanto, a nossa opção no presente estudo foi a de estabelecer três protótipos com formações diferentes quanto à utilização das proteínas recombinantes na plataforma imunoenzimática.

Foram preparados protótipos com variações do antígeno recombinante ligado na microplaca (fase sólida) e a proteína recombinante utilizada como conjugado. Sendo assim definimos três tipos de protótipos a serem analisados:

1) GST-CRA&FRA como antígeno ligado à fase sólida e conjugado utilizando as construções  $\beta$ -gal-CRA e  $\beta$ -gal-FRA ligadas à HRP. Esta concepção é a mesma do modelo padronizado à época em que o kit foi registrado por Bio-Manguinhos junto a ANVISA.

2) Histidina-CRA&FRA como antígeno ligado à fase sólida e conjugado utilizando a construção Histidina-CRA&FRA ligada à HRP.

3) GST-CRA&FRA como antígeno ligado à fase sólida e conjugado utilizando a construção Histidina-CRA&FRA ligada à HRP.

### **3.5.1 - Determinação dos títulos de antígeno e conjugado – Protótipos 2 e 3.**

O ensaio imunoenzimático foi padronizado de forma a determinar os títulos do antígeno, bem como a melhor concentração do conjugado (*Checkboarder*) frente aos antissoros anti-CRA e anti-FRA que funcionam como calibradores positivos da reação e frente ao soro bovino adulto, como um calibrador negativo da reação (Figura 3.1).

Em uma microplaca (*U-bottom strip plates* – Greiner) foram distribuídos 50  $\mu$ L de uma solução de tampão carbonato/bicarbonato contendo várias concentrações do antígeno recombinante (variando de 175 ng a 5600 ng) GST-CRA&FRA (placas 01(a) e 02(a)). O mesmo procedimento foi realizado com o antígeno Histidina-CRA&FRA (placas 01(b) e 02(b)). As diferentes concentrações antigênicas (175, 350, 700ng) foram adicionadas as placas 01(a) e 01(b) enquanto concentrações maiores (1400, 2800, 5600ng) foram adicionadas as placas 02(a) e 02(b), conforme representação esquemática na Figura 3.1. Após o período de 16 a 18 horas de incubação a 4°C, foram efetuadas 3 lavagens (Tecan) com tampão de lavagem (250  $\mu$ L por poço), para a retirada do material não adsorvido às cavidades das microplacas.

Foram então distribuídos 50 µL dos antissoros padrões, de forma a obtermos uma disposição na placa onde o soro anti-CRA, o soro anti-FRA, o soro bovino e o diluente do conjugado (sem soro) fossem avaliados com a mesma concentração de antígeno e a mesma diluição do conjugado (Figura 3.1). Após um período de incubação de 30 minutos a 37°C, sucedeu-se lavagem com tampão de lavagem para a retirada do material não adsorvido. Em seguida, adicionou-se às cavidades da microplaca, diluições respectivas a cada coluna (figura 3.1) do conjugado Histidina-CRA&FRA marcado com HRP, incubando-se por 30 minutos a temperatura de 37°C.

Procedeu-se a nova lavagem, com tampão de Lavagem para a retirada do conjugado não ligado. Esta reação foi revelada adicionando-se à cavidade da microplaca 100 µL de uma solução contendo o diluente do substrato, solução de substrato e solução cromógena. Após incubação de 30 minutos a temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de solução de ácido sulfúrico 2M e as densidades óticas foram mensuradas a 450nm em leitor de ELISA (Tecan).

### **3.5.2 - Determinação dos títulos dos conjugados em função do título do antígeno – Protótipo 1.**

O ensaio imunoenzimático foi padronizado de forma a determinar os títulos dos conjugados  $\beta$ -gal-CRA e  $\beta$ -gal-FRA ligados à HRP em função da concentração antigênica ideal de GST-CRA&FRA já estabelecida na padronização do protótipo 3 (item 3.5.1), uma vez que estes dois protótipos tem em comum a mesma preparação antigênica com os antissoros ( $\alpha$ -CRA e  $\alpha$ -FRA) de coelho.

Em uma microplaca (*U-bottom strip plates* – Greiner) foram distribuídos 50 µL de uma solução tampão de carbonato/bicarbonato contendo 700ng do antígeno recombinante GST-CRA&FRA. Após o período de 16 a 18 horas de incubação (*overnight*) a 4°C foram efetuadas 3 lavagens com Tampão de Lavagem, 250 µL por poço para a retirada do material não adsorvido às cavidades das microplacas.

### Disposição das Amostras Placa 01(a) e Placa 01(b)

	Ag 175 ng				Ag 350 ng				Ag 700 ng			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA
B	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA
C	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA
D	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA
E	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
F	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
G	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	R	SS	SS	SS
H	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
	Conjugado				Conjugado				Conjugado			

### Disposição das Amostras Placa 02(a) e Placa 02(b)

	Ag 1400 ng				Ag 2800 ng				Ag 5600 ng			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA
B	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA
C	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA
D	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA
E	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
F	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
G	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	R	SS	SS	SS
H	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
	Conjugado				Conjugado				Conjugado			

Figura 3.1 Representação esquemática de um teste EIE para determinação da concentração dos antígenos e do título do conjugado.

Antígenos - GST-CRA&FRA e Histidina-CRA&FRA

Conjugado - Histidina-CRA&FRA-HRP

Placa 01(a) e 2(a) – Antígeno GST-CRA&FRA

Placa 01(b) e 2(b) – Antígeno Histidina-CRA&FRA

Foram distribuídos 50  $\mu$ L dos anti-soros padrão, de forma a obtermos uma disposição na placa onde tanto o soro anti-CRA, soro anti-FRA, soro bovino e diluente do conjugado (sem soro) fossem avaliados com a mesma concentração do antígeno e uma mesma diluição do conjugado (Figura 3.2). Após um período de incubação de 30 minutos a 37°C, sucedeu-se lavagem com PBS-T para a retirada do material não adsorvido nesta etapa da reação. Em seguida, adicionou-se às cavidades da microplaca, as diluições respectivas do conjugado  $\beta$ -gal-CRA e  $\beta$ -gal-FRA marcado com HRP em colunas separadas  $\beta$ -gal-CRA - colunas 1 a 4;  $\beta$ -gal-FRA - colunas 5 a 6, incubando-se por 30 minutos a 37°C.

Para a retirada do conjugado não ligado usou-se um tampão de lavagem. A reação foi revelada adicionando-se à cavidade da microplaca 100  $\mu$ L de uma solução contendo o diluente do substrato, solução de substrato e solução cromógena seguida por incubação de 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 50  $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico 2M e as densidades óticas foram mensuradas a 450nm em leitor de ELISA.

	Ag [ ] ng				Ag [ ] ng			
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA
B	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA	$\alpha$ CRA
C	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA
D	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA	$\alpha$ FRA
E	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
F	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
G	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
H	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:50	1:100	1:200	1:400
	Conjugado $\beta$ -gal-CRA/HRP				Conjugado $\beta$ -gal-FRA/HRP			

Figura 3.2 Representação esquemática de um teste EIE para a determinação do título dos conjugados.

Antígeno - GST-CRA&FRA

Conjugado -  $\beta$ -gal-CRA e  $\beta$ -gal-FRA

### **3.5.3 - Montagem dos protótipos**

Foi preparado 1 lote experimental de cada protótipo contendo os seguintes componentes:

- 1) Tampão de Lavagem [20X]
- 2) Diluente do conjugado
- 3) Diluente do substrato
- 4) Cromógeno
- 5) Substrato
- 6) Ácido Sulfúrico 2M
- 7) Calibrador Positivo
- 8) Calibrador Negativo
- 9) Conjugado
- 10) Tiras Sensibilizadas
- 11) Manual de instrução (anexo 8.2)

Os componentes listados de 1 a 6 foram produzidos e cedidos pelo SESOD (Setor de Soluções e Diluentes – DERED – VPROD). Os itens de 7 a 10 foram preparados conforme as descrições abaixo.

#### **3.5.3.1 - Preparo dos Calibradores**

Foi utilizado como calibrador positivo soro anti-CRA obtido em coelho (DI 1436), adicionado do conservante kathon CG (Rohm and Haas Company) na proporção de 0,1%.

Foi utilizado como calibrador Negativo soro bovino adulto (Cultlab), adicionado do conservante kathon CG (Rohm and Haas Company) na proporção de 0,1%.

### **3.5.3.2 - Preparo do Conjugado**

O conjugado a ser utilizado no teste EIE foi diluído da solução mãe (preparado conforme os itens 3.4.1;3.4.2 e 3.4.3), em estabilizante comercial para peroxidase (Scripps) – conservado de 2 a 8°C, na diluição estabelecida no teste de padronização.

### **3.5.3.3 - Sensibilização das placas**

As microplacas utilizadas nos protótipos tem formato de fundo em U e estão dispostas em tiras duplas de encaixe, totalizando 96 orifícios. A sensibilização foi realizada utilizando-se o antígeno recombinante de cada protótipo diluído na concentração antigênica definida no teste de padronização (itens 3.5.1 e 3.5.2) em tampão carbonato/bicarbonato 0,01M, 50 µl por poço, por um período de 16 a 18 horas de incubação a 4°C. Posteriormente, foram efetuadas 3 lavagens, com tampão de lavagem (250 µl por poço) para a retirada do material não adsorvido às cavidades das microplacas.

Para conservação das placas sensibilizadas à temperatura de 2 a 8°C, seguiu-se a um processo de selagem das microplacas com adição de 50 µl por poço de tampão *post-coating* (Kolossova et al., 2006) contendo BSA 0,5%, sacarose 6%, kathon CG 0,1%, álcool polivinílico 4% em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.2. Imediatamente após aspirou-se a placa para a retirada desta solução, seguida de incubação por 1 hora a 37°C, em estufa, para completa secagem do selante nas microplacas. Logo após este período, as placas foram hermeticamente seladas com plástico, etiquetadas e armazenadas a 2 a 8°C.

## **3.6 - Avaliação da padronização dos protótipos.**

Para a avaliação dos três protótipos inicialmente foi realizado um ensaio com os soros calibradores positivo e negativo além do diluente sem soro. Considerou-se o ensaio válido quando os valores de densidade ótica situaram-se na faixa descrita abaixo (anexo 8.2):



- Calibrador Positivo:  $\geq 0,500$  de densidade ótica
- Calibrador Negativo:  $\geq 0,050 \leq 0,120$  de densidade ótica.

Este critério de validação deve ser atendido a cada ensaio e caso os controles não apresentem valores dentro da faixa estabelecida, o ensaio deverá ser repetido.

### **3.7 - Avaliação do desempenho dos protótipos**

#### **3.7.1 - Critérios de Inclusão e exclusão das amostras**

Os critérios de inclusão de indivíduos como chagásicos baseiam-se na presença de exames laboratoriais reagentes em pelo menos dois ensaios de princípios metodológicos diferentes com, evidenciação da presença do parasito (*T. cruzi*) por meio de um teste parasitológico positivo, além de informações clínicas com a presença de sinais, sintomas e dados epidemiológicos, indicativos de doença de Chagas (Ministério da Saúde, 1998).

Por outro lado, os critérios de exclusão de indivíduos baseiam-se na observação de resultados sorológicos não reagentes, ausência de dados clínicos, ou seja, indivíduos sadios e sem histórico epidemiológico tais como relato de recebimento de transfusão, residência em área endêmica ou contato com vetor.

Em função da indisponibilidade de amostras que atendessem a todos os itens relacionados nos critérios de inclusão citados anteriormente, adotamos parâmetros diferentes para cada fase do estudo contando com as amostras que dispunhamos. Também não foi possível fazer um dimensionamento amostral adequado supondo-se sensibilidade e especificidade superiores a 90% e erro amostral de 5%.

Sendo assim, a avaliação dos protótipos foi realizada em três fases: fase I com um grupo de amostras visando uma análise do desempenho dos três protótipos frente as metodologias convencionais e identificação de possíveis divergências; fase II com o objetivo de desafiar os protótipos com amostras que atendiam aos critérios sorológicos, clínicos e epidemiológicos de uma soroteca do Centro de Referência, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CpqAM/FIOCRUZ); a fase III com amostras

oriundas do Hemocentro de Uberaba mas que possuíam uma caracterização bem completa com resultados sorológicos por EIE e IFI além de Hemocultura.

### **3.7.2 - Fase I**

Os critérios de inclusão das amostras usados como consenso positivo nesta fase, foram a positividade em dois testes sorológicos de princípios diferentes e os de exclusão usados como consenso negativo foi a ausência de positividade em dois testes sorológicos de princípios diferentes.

A avaliação dos protótipos foi realizada com um painel de soros do LATED, composto por 301 amostras cedidas por diversos Institutos de Pesquisa do país sendo 98 com sorologia positiva para doença de Chagas por IFI e EIE, e 203 com sorologia negativa, sendo 100 oriundas de serviços de hemoterapia.

A avaliação foi realizada em conjunto como uma mesma amostra sendo testada nos três protótipos simultaneamente. Assim conseguimos realizar cada ensaio em uma placa inteira, 28 amostras aleatoriamente selecionadas, sendo avaliadas nos protótipos 1, 2 e 3 (Figura 3.3). Desta forma, foi possível realizar a padronização simultânea nos três protótipos eliminando o viés de variações com as amostras testadas em momentos diferentes ao longo do estudo.

Foi calculado para cada amostra o índice de reatividade (IR) = D.O (Densidade ótica) / CO (anexo - 8.2), no sentido de normalizar e aproximar o ensaios, visto que a cada ensaio um valor de CO foi gerado. Os valores de IR gerados na fase I foram inseridos em um gráfico do programa Graphpad Prism 5.

	Tiras Protótipo 1				Tiras Protótipo 2				Tiras Protótipo 3			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	05	13	21	CP	05	13	21	CP	05	13	21
B	CN	06	14	22	CN	06	14	22	CN	06	14	22
C	CN	07	15	23	CN	07	15	23	CN	07	15	23
D	S/S	08	16	24	S/S	08	16	24	S/S	08	16	24
E	01	09	17	25	01	09	17	25	01	09	17	25
F	02	10	18	26	02	10	18	26	02	10	18	26
G	03	11	19	27	03	11	19	27	03	11	19	27
H	04	12	20	28	04	12	20	28	04	12	20	28
	Conjugado Protótipo 1				Conjugado Protótipo 2				Conjugado Protótipo 3			

Figura 3.3 – Representação esquemática das avaliações das fases I e II.

CP: Controle Positivo;

CN: Controle Negativo;

S/S: Sem soro.

### 3.7.3 - Fase II

Os critérios de inclusão das amostras (consenso positivo) e de exclusão (consenso negativo) usados nesta fase foram os mesmos adotados na fase I com a adição dos parâmetros indicação clínica e epidemiológica para as amostras positivas (consenso positivo).

A fase II foi realizada no CPqAM/FIOCRUZ com 143 amostras positivas de uma soroteca de pacientes oriundos de Unidades de Saúde (HUOC,HEMOPE) além de 68 amostras negativas. Também foram incluídos na fase II, 87 soros com critérios sorológicos negativos para doença de Chagas mas positivos para outras patologias (43 de HIV, 25 de Sífilis, 13 de Hepatites, 3 de HTLV e 3 de Leishmaniose).

Assim como na fase I, realizamos o estudo em uma placa inteira com 28 amostras de soros aleatoriamente selecionadas e avaliação simultânea nos três protótipos ao mesmo tempo (Fig.3.3).

Para cada amostra foi calculado o índice de reatividade (IR) = D.O/CO e os valores de IR gerados nesta fase foram inseridos em um gráfico do programa Graphpad Prism 5.

### 3.7.4 - Fase III

Nesta fase os protótipos foram avaliados com amostras de um painel de soros provenientes do Hemocentro de Uberaba; com resultados de testes sorológicos e parasitológicos (hemocultura).

Os critérios para a inclusão das amostras como consenso positivo nesta fase foram a presença de pelo menos dois testes sorológicos positivos com princípios diferentes e ocorrência ou não de teste parasitológico positivo.

Os critérios de exclusão, (consenso negativo) foram a ausência de positividade em pelo menos dois testes sorológicos de princípios metodológicos diferentes com resultado parasitológico negativo.

O painel contava com 29 amostras do consenso negativo e 29 do consenso positivo, das quais 12 apresentavam exame parasitológico positivo, além de 17 negativos.

Como o volume das amostras não era suficiente para ser incluído nas três avaliações (protótipos 1, 2 e 3), optamos por analisar as amostras no protótipo que obteve o melhor desempenho com relação aos parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, durante a avaliação das fases I e II.

Também foi calculado para cada amostra o índice de reatividade (IR) =  $D.O/CO$ , para normalizar e aproximar os ensaios, visto que a cada ensaio um valor de CO foi gerado. Os valores de IR da fase III foram inseridos em um gráfico do programa Graphpad Prism 5.

### 3.8 - Análise Estatística

Os parâmetros sensibilidade, especificidade, valore preditivo positivo e negativo foram estimados de acordo com Ferreira & Ávila (2001), utilizando uma tabela de dupla entrada relacionando o diagnóstico da doença e os resultados dos testes (Tabela 3.1), com intervalo de confiança (IC) de 95% usando o programa Epi Info TM 6.04.

**Tabela 3.1 - Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença**

TESTES	DOENÇA – Diagnóstico verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiros positivos A	Falsos positivos B
	Falsos negativos C	Verdadeiros negativos D

(Ferreira & Ávila, 2001).

A sensibilidade (S) do teste é dada pela percentagem de indivíduos positivos detectados pelo teste dentre total de indivíduos sabidamente doentes. A especificidade (E) é obtida pela percentagem de indivíduos negativos, dentre os indivíduos não doentes. O valor preditivo positivo (VPP) refere-se à probabilidade de um indivíduo ter a doença se o resultado do teste for positivo, enquanto que o valor preditivo negativo (VPN) refere-se à probabilidade de um indivíduo não ter a doença quando o resultado do teste for negativo. Esses parâmetros, e seus respectivos intervalos de confiança (IC), com grau de confiança de 95% foram determinados segundo as fórmulas apresentadas na figura 3.4:

$$S = \frac{A}{A + C} \qquad VPP = \frac{A}{A + B}$$

$$E = \frac{D}{B + D} \qquad VPN = \frac{D}{C + D}$$

$$EP = \sqrt{\frac{PAR \cdot (100 - PAR)}{n}} \qquad IC = PAR \pm t \times EP$$

Figura 3.4 – Fórmulas utilizadas para avaliação estatística. Onde IC = Intervalo de confiança; PAR = parâmetro (S, E, VPP ou VPN); t = Valor da t de Student para IC

95% (1,96); EP = erro padrão e n = corresponde ao valor do denominador base para cálculo do parâmetro correspondente (sensibilidade n = A + C; especificidade n = B + D; VPP então n = A + B; VPN então n = C + D).

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Expressão das proteínas recombinantes.

A expressão das diferentes proteínas recombinantes utilizadas nesta dissertação foi avaliada antes e após a adição de IPTG por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) à 12%. Em todos os casos foi observada a expressão da proteína heteróloga em cada uma das construções propostas (vide indicação da seta, Figuras 4.1 e 4.2).

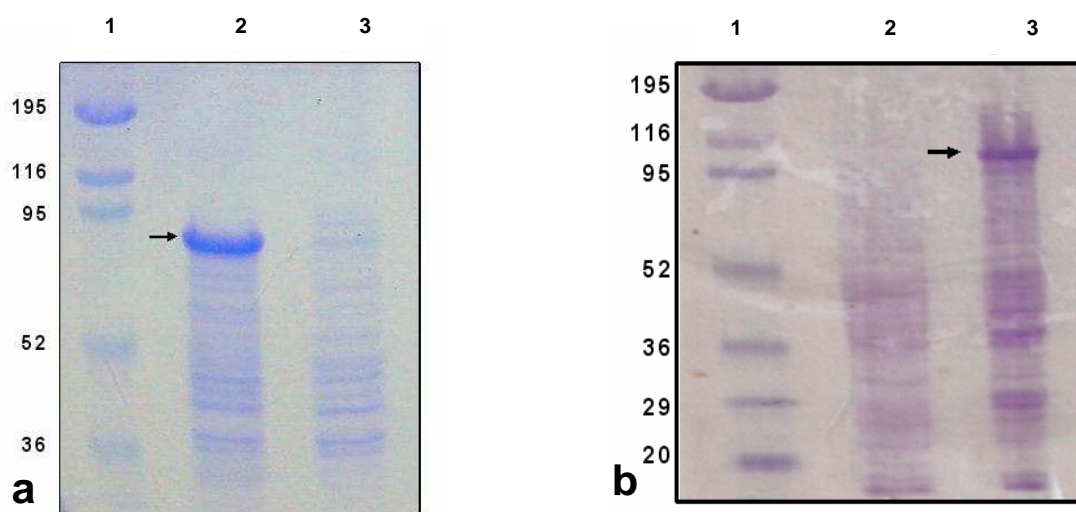


Figura 4.1– Avaliação da expressão das proteínas recombinantes Histidina-CRA&FRA e GST-CRA&FRA por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As raias 1 em todos os painéis representam o padrão de peso molecular pré-corado (Biorad).

Painel a: raia 2 - expressão do recombinante Histidina-CRA&FRA após indução com IPTG; raia 3 - amostra do caldo de cultivo da *E. coli* produtora de Histidina-CRA&FRA antes da indução.

Painel b: raia 2- amostra do caldo de cultivo da *E. coli* produtora de GST-CRA&FRA antes da indução; raia 3 - expressão do recombinante GST-CRA&FRA após indução com IPTG. A seta marca a posição esperada para a proteína recombinante expressa após indução com IPTG.

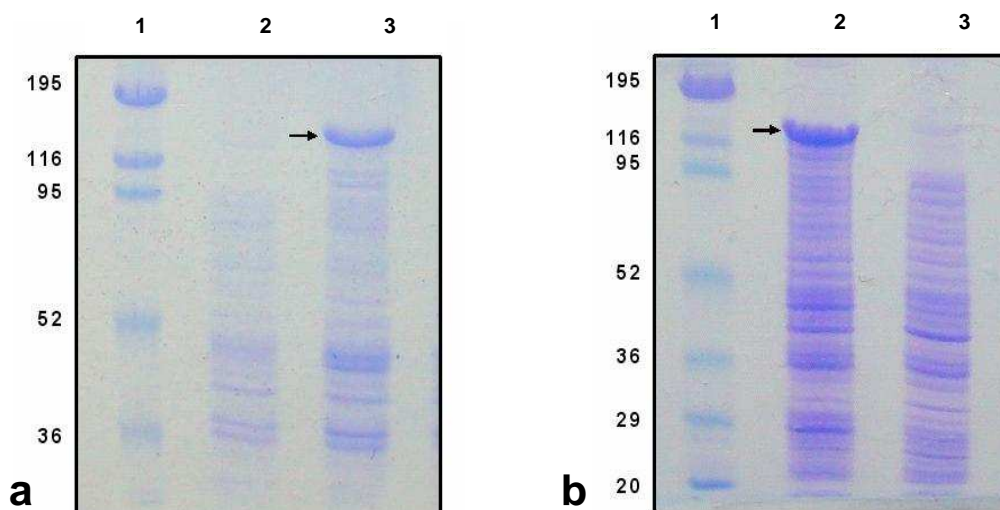


Figura 4.2 – Avaliação da expressão das proteínas recombinantes  $\beta$ -gal-CRA e  $\beta$ -gal-FRA por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As raias 1 em todos os painéis representam o padrão de peso molecular pré-colorado (Biorad).

Painel a: raia 2- amostra do caldo de cultivo da *E. coli* produtora de  $\beta$ -gal-CRA antes da indução; raia 3 - expressão do recombinante  $\beta$ -gal-CRA após indução com IPTG.

Painel b: raia 2 - expressão do recombinante  $\beta$ -gal-FRA após indução com IPTG; raia 3 - amostra do caldo de cultivo da *E. coli* produtora de  $\beta$ -gal-FRA antes da indução. A seta marca a posição esperada para a proteína recombinante expressa após indução com IPTG.

## 4.2 - Purificação das proteínas recombinantes

Após o rompimento celular, os sobrenadantes contendo as proteínas solúveis dos recombinantes fusionados a peptídeos (histidina), a GST e a  $\beta$ -gal foram submetidos a purificação por cromatografia líquida, utilizando-se a metodologia mais adequada para cada caso.

### 4.2.1 - Histidina-CRA&FRA

A análise eletroforética das frações eluídas na cromatografia por metal imobilizado (IMAC-Ni) mostrou uma banda intensa, relativa a proteína recombinante Histidina CRA&FRA (Figura 4.3, raias 3, 4 e 5 vide indicação da seta), que

corresponde as frações coletadas na etapa de eluição com tampão contendo Imidazol 250mM (Figura 4.3).

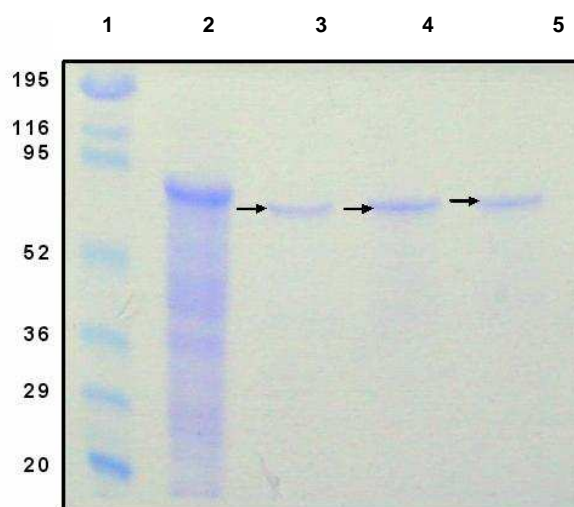


Figura 4.3 - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% das frações da proteína recombinante Histidina CRA&FRA isoladas por cromatografia de afinidade. Raia 1: Padrão de peso molecular; (KDa). Raia 2: Extrato bruto antes da afinidade (12 $\mu$ g); Raias 3, 4 e 5: 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> eluídos da cromatografia de afinidade.

#### 4.2.2 - GST-CRA&FRA

As frações deslocadas com glutathione reduzida 10mM foram analisadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (Figura 4.4).

A análise eletroforética das frações eluídas na resina glutathione sepharose também mostrou uma banda eletroforética intensa, relativa a proteína recombinante GST-CRA&FRA (raias 3, 4 e 5 vide indicação da seta) e algumas bandas de contaminantes de menor peso molecular (Figura 4.4). Estas frações foram reunidas e dessalinizadas por diálise. Após concentração a massa final do *pool* de GST-CRA&FRA foi estimada em 1,38 mg/mL. Este material foi então utilizado como antígeno no teste EIE durante padronização dos protótipos 1 e 3.



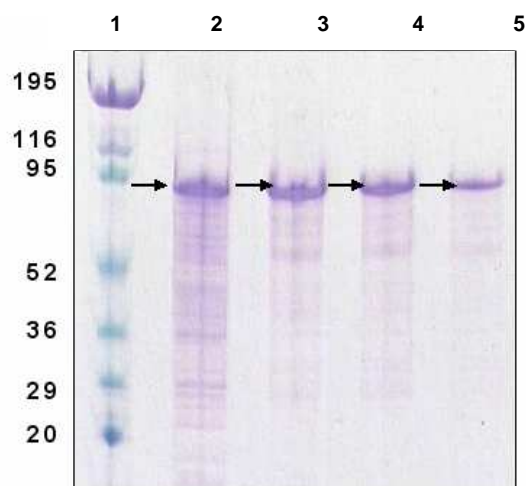


Figura 4.4 - Eletroforese desnaturante em gradiente de gel de poliacrilamida 8-25% das frações da proteína recombinante GST-CRA&FRA obtidas por cromatografia de afinidade. Raia 1: Padrão de peso molecular (KDa); Raia 2: Extrato bruto antes da afinidade (7 µg); Raias 3, 4 e 5: 1º, 2º e 3º eluídos na cromatografia de afinidade.

#### 4.2.3 - Cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular

Os sobrenadantes das culturas lisadas contendo as proteínas recombinantes  $\beta$ -gal-CRA e  $\beta$ -gal-FRA foram, em separado, purificados por cromatografia de troca aniônica em coluna Poros HQ (Figuras 4.5 e 4.6). Em ambos os casos, os produtos recombinantes contendo a  $\beta$ -gal foram recolhidos na fração correspondente ao pico eluído com 40% do gradiente salino (vide seta Figura 4.5 e Figura 4.6 e Figuras 4.7 e 4.8). Posteriormente os concentrados da fração  $\beta$ -gal-CRA e da  $\beta$ -gal-FRA, foram, individualmente, submetidos a cromatografia de exclusão e peneiração molecular (Figuras 4.7 e 4.8). Em ambos os casos os picos eluídos oriundos da IEX e da cromatografia de exclusão molecular foram reunidos e avaliados por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, (figuras 4.9 e 4.10).

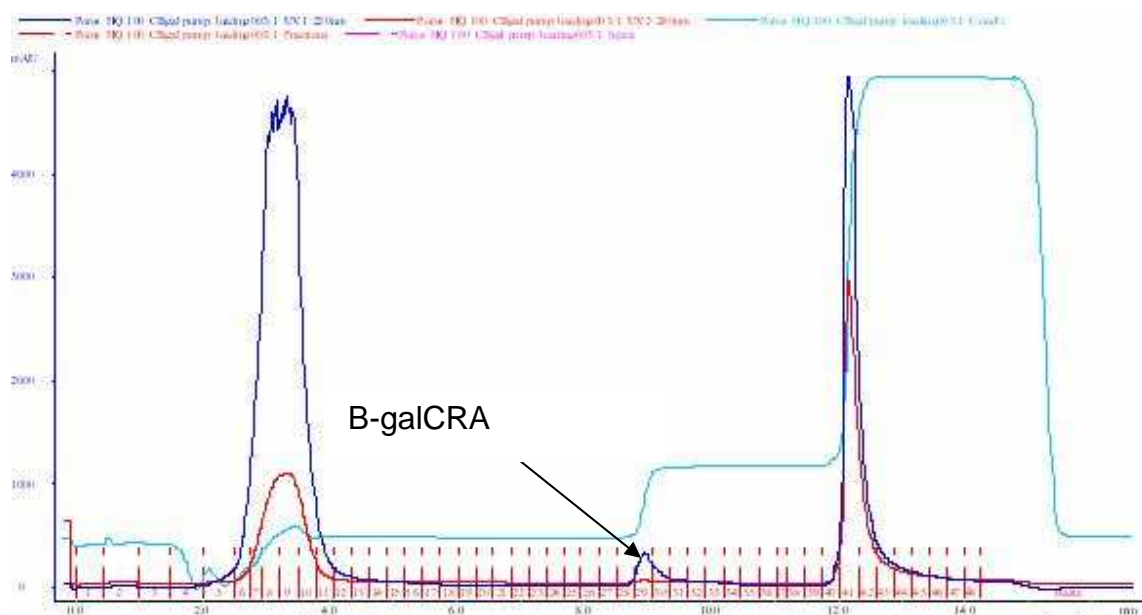


Figura 4.5 - Cromatografia de troca aniônica em coluna Poros HQ do extrato bruto de  $\beta$ -gal-CRA. Utilizou-se um gradiente em degrau, com a eluição da proteína recombinante  $\beta$ -gal-CRA em 40% do tampão de eluição. Seta correspondente às frações colhidas.

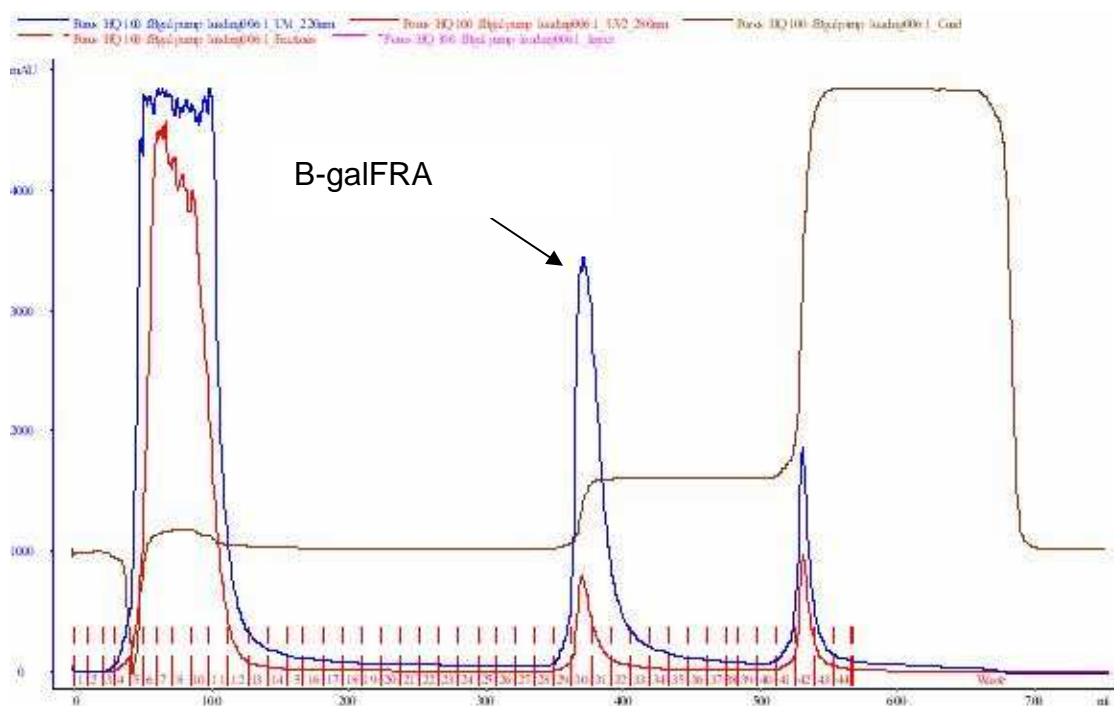


Figura 4.6 - Cromatografia de troca aniônica em coluna Poros HQ do extrato bruto de  $\beta$ -gal-FRA. Utilizou-se um gradiente em degrau, com a eluição da proteína recombinante  $\beta$ -gal-FRA em 40% do tampão de eluição. Seta correspondente às frações colhidas.

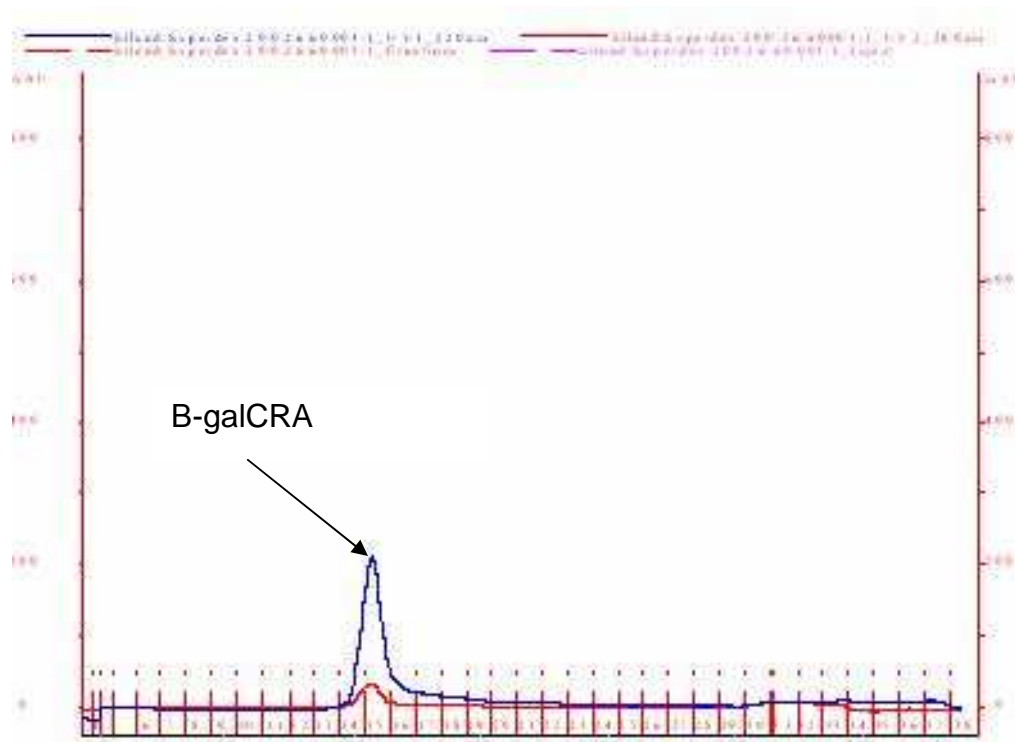


Figura 4.7 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 da proteína recombinante  $\beta$ -gal-CRA. Seta correspondente às frações colhidas.

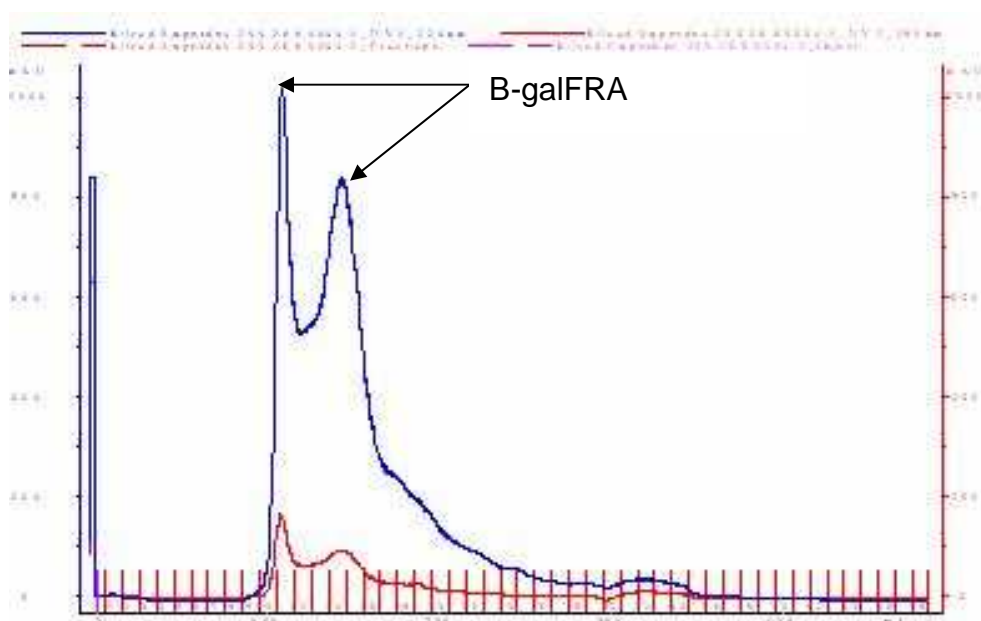


Figura 4.8 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 da proteína recombinante  $\beta$ -gal-FRA. Seta correspondente às frações colhidas.

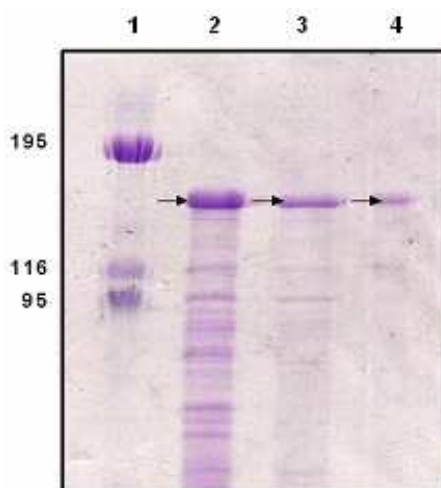


Figura 4.9 - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 7,5% da proteína  $\beta$ -gal-CRA purificada. Raia 1: Padrão de peso molecular (KDa); Raia 2: Extrato bruto de  $\beta$ -gal-CRA (5  $\mu$ g), Raia 3: Material concentrado após IEX (5  $\mu$ g), Raia 4: Material concentrado após cromatografia exclusão molecular e após diálise tampão carbonato de sódio 0,01M (1,2  $\mu$ g).

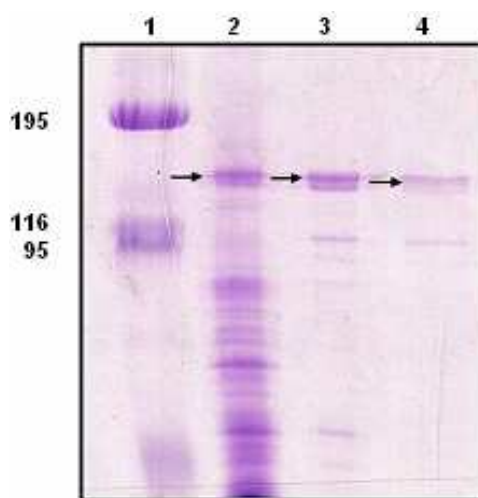


Figura 4.10 - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 7,5% da proteína  $\beta$ -gal-FRA purificada. Raia 1: Padrão de peso molecular (KDa); Raia 2: Extrato bruto de  $\beta$ -gal-FRA (2,7  $\mu$ g), Raia 3: Material concentrado após IEX (0,2  $\mu$ g), Raia 4: Material concentrado após cromatografia exclusão molecular e após diálise tampão carbonato de sódio 0,01M (10  $\mu$ g).

### **4.3 - Padronização dos protótipos**

#### **4.3.1 - Determinação da concentração do antígeno e do título do conjugado – Protótipos 2 e 3.**

As concentrações de antígeno usadas foram correspondentes aquelas que permitissem uma DO situada na faixa de 1,2 a 1,5 para o controle positivo e de 0,050 a 0,120 para o controle negativo. Como pode ser visto nas figuras 4.11 e 4.12, as faixas que estariam concorrendo para a escolha da concentração antigênica, encontram-se acima de 700ng, para ambos os antígenos GST-CRA&FRA (Figura 4.11) e Histidina-CRA&FRA (Figura 4.12). Assim, foi usada a concentração de 700 ng para ambos antígenos. Quanto ao título do conjugado (Histidina-CRA&FRA/HRP), optamos pela diluição 1:4000 pois foi a faixa onde as D.O dos controles positivos ( $\alpha$ CRA e  $\alpha$ FRA ) encontraram-se situadas dentro do intervalo limite aceitável de 1,2 a 1,5 e os controles negativos apresentavam reação, ou seja, D.O fora da faixa de 0,050 a 0,120. Fizemos uma pré-diluição do conjugado de 1:40 em estabilizante comercial e utilizamos a diluição 1:100 deste conjugado nos ensaios.

#### **4.3.2 - Determinação da concentração do antígeno e do título do conjugado – Protótipo 1**

Para o protótipo 1, optamos por trabalhar com a mesma concentração antigênica (700ng) definida na padronização do protótipo 3, uma vez que ambos apresentam o mesmo antígeno ligado na fase sólida do EIE. Com relação ao conjugado, como a quantidade de proteína conjugada foi inferior a que convencionalmente se utiliza para a obtenção de títulos mais elevados, partimos de diluições do conjugado abaixo do que testamos para o conjugado Histidina-CRA&FRA/HRP. O critério de escolha do título seguiu o mesmo padrão do protótipo 3 onde o título se define pela D.O dos anti-soros CRA para o conjugado  $\beta$ -gal-CRA/HRP e anti-soros FRA para o conjugado  $\beta$ -gal-FRA/HRP no limite aceitável de 1,2 a 1,5 de D.O, sem que os controles negativos correspondentes apresentassem reação, ou seja, D.O fora da faixa de 0,050 a 0,120.

Sendo assim a diluição de escolha foi de 1:50 para o conjugado  $\beta$ -gal-CRA/HRP e 1:100 para o conjugado  $\beta$ -gal-FRA/HRP. Seguindo a padronização obtida para estes lotes, nos ensaios de avaliação utilizamos uma diluição do conjugado 1:10 para o protótipo 1 e para os protótipos 2 e 3 utilizamos a diluição 1:100.

A especificidade dos conjugados  $\beta$ -gal-CRA/HRP e  $\beta$ -gal-FRA/HRP, pode ser observada na Figura 4.13 (D.O. marcadas em cor azul), onde não houve reação dos antissoros CRA, por exemplo, com o conjugado  $\beta$ -gal-FRA/HRP e vice-versa.

**Placa 01(a)**

	Ag 175 ng				Ag 350 ng				Ag 700 ng			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,386	0,331	0,233	0,182	0,762	0,589	0,402	0,307	1,364	1,094	0,761	0,556
B	0,416	0,349	0,254	0,183	0,736	0,615	0,421	0,317	1,32	1,14	0,844	0,55
C	0,834	0,72	0,533	0,359	1,414	1,038	0,739	0,459	1,702	1,508	1,08	0,632
D	0,83	0,852	0,498	0,377	1,144	1,021	0,719	0,471	1,489	1,368	0,964	0,623
E	0,068	0,055	0,053	0,049	0,06	0,059	0,094	0,051	0,068	0,061	0,054	0,049
F	0,061	0,056	0,051	0,046	0,061	0,197	0,116	0,047	0,082	0,063	0,055	0,053
G	0,059	0,054	0,28	0,048	0,061	0,089	0,048	0,048	0,055	0,053	0,048	0,052
H	0,368	0,061	0,051	0,05	0,172	0,159	0,05	0,046	0,069	0,06	0,061	0,053
	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
	Conjugado				Conjugado				Conjugado			

	Ag 1400 ng				Ag 2800 ng				Ag 5600 ng			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,956	1,592	1,257	0,854	2,12	1,862	1,387	0,951	2,246	1,706	1,329	0,867
B	1,927	1,583	1,352	0,918	2,0	1,818	1,428	0,94	2,091	1,898	1,213	0,897
C	2,135	1,587	1,167	0,725	2,128	1,723	1,258	0,679	2,07	1,638	1,177	0,736
D	1,997	1,705	1,171	0,694	2,008	1,67	1,171	0,731	2,096	1,673	1,164	0,694
E	0,090	0,073	0,064	0,061	0,127	0,135	0,113	0,053	0,254	0,081	0,064	0,059
F	0,087	0,382	0,060	0,065	0,088	0,077	0,06	0,055	0,411	0,071	0,066	0,060
G	0,541	0,186	0,061	0,083	0,253	0,068	0,164	0,055	0,314	0,155	0,067	0,057
H	0,230	0,086	0,75	0,072	0,081	0,079	0,063	0,102	0,170	0,088	0,062	0,063
	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
	Conjugado				Conjugado				Conjugado			

### Placa 02(a)

Figura 4.11 – Resultado das densidades óticas dos antissoros CRA, antissoros FRA e calibrador negativo no ensaio de padronização do protótipo 3.

Placa 01(a) e 2(a) – Antígeno GST-CRA&FRA; Conjugado : Histidina-CRA&FRA-HRP

Coluna 10 da Placa 01(a) – Título do conjugado do protótipo 3.

### Placa 01(b)

	Ag 175 ng				Ag 350 ng				Ag 700 ng			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,492	1,385	0,851	0,473	1,682	1,09	,646	0,445	1,746	1,211	0,710	0,421
B	1,98	1,21	0,765	0,42	1,492	1,047	0,629	0,385	1,655	1,107	0,677	0,433
C	2,43	1,822	1,222	0,667	2,16	1,654	1,07	0,646	2,294	1,576	1,179	0,743
D	2,307	1,839	1,082	0,697	2,035	1,583	0,997	0,635	2,031	1,511	1,148	0,727
E	0,137	0,092	0,064	0,054	0,139	0,087	0,063	0,061	0,149	0,091	0,069	0,06
F	0,147	0,094	0,066	0,055	0,137	0,09	0,065	0,054	0,14	0,102	0,069	0,06
G	0,139	0,087	0,069	0,053	0,134	0,085	0,065	0,054	0,140	0,102	0,069	0,060
H	0,143	0,094	0,69	0,056	0,123	0,082	0,077	0,054	0,129	0,091	0,068	0,056
	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
	Conjugado				Conjugado				Conjugado			

### Placa 02(b)

	Ag 1400 ng				Ag 2800 ng				Ag 5600 ng			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,358	1,547	0,949	0,571	2,019	1,54	0,944	0,556	2,103	1,601	0,933	0,607
B	2,083	1,415	0,88	0,522	2,034	1,416	0,871	0,539	2,091	1,547	0,878	0,066
C	2,714	1,906	1,407	0,821	2,546	2,043	1,449	0,903	2,625	2,22	1,556	0,943
D	2,58	1,959	1,395	0,806	2,469	2,134	1,351	0,919	2,575	2,174	1,549	0,99
E	0,192	0,103	0,073	0,058	0,192	0,113	0,080	0,062	0,241	0,124	0,083	0,065
F	0,178	0,11	0,07	0,058	0,195	0,106	0,077	0,056	0,201	0,117	0,077	0,062
G	0,185	0,123	0,084	0,061	0,170	0,097	0,072	0,065	0,278	0,118	0,082	0,062
H	0,168	0,166	0,083	0,061	0,151	0,111	0,074	0,060	0,168	0,119	0,078	0,065
	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
	Conjugado				Conjugado				Conjugado			

Figura 4.12 - Resultado das densidades óticas dos antissoros CRA, antissoros FRA e do calibrador negativo no ensaio de padronização do protótipo 2.

Placa 01(b) e 2(b) – Antígeno Histidina-CRA&FRA; Conjugado : Histidina-CRA&FRA-HRP

Coluna 10 da Placa 01(b) – Título do conjugado do protótipo 2.

	Ag 700 ng				Ag 700 ng			
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1,248	0,838	0,516	0,405	0,201	0,124	0,090	0,071
B	1,149	0,827	0,600	0,380	0,178	0,124	0,083	0,079
C	0,114	0,099	0,072	0,062	1,335	1,233	1,044	0,622
D	0,104	0,094	0,074	0,053	1,414	1,029	1,035	0,647
E	0,115	0,112	0,089	0,083	0,145	0,100	0,079	0,082
F	0,105	0,106	0,088	0,071	0,141	0,098	0,085	0,070
G	0,102	0,095	0,068	0,059	0,149	0,108	0,073	0,067
H	0,106	0,119	0,084	0,060	0,160	0,098	0,074	0,070
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:50	1:100	1:200	1:400
	Conjugado $\beta$ -gal-CRA/HRP				Conjugado $\beta$ -gal-FRA/HRP			

Figura 4.13 - Resultado das densidades óticas dos anti-soros CRA, anti-soros FRA e calibrador negativo no ensaio de padronização do protótipo 1. Coluna 1 – Título do conjugado  $\beta$ -gal-CRA. Coluna 6 - Título do conjugado  $\beta$ -gal-FRA.

#### 4.4 - Avaliação da padronização nos três protótipos.

Realizamos um ensaio de validação de cada protótipo com os soros anti-CRA, anti-FRA, calibrador negativo e sem soro. O quadro 4.1 mostra os resultados do teste para cada protótipo e as respectivas médias e desvio padrão das densidades óticas de cada grupo. Os ensaios foram validados seguindo o critério:

- Calibrador Positivo (soro anti-CRA ou soro anti-FRA):  $\geq 0,500$  de densidade ótica
- Calibrador Negativo e o sem soro:  $\leq 0,120$  de densidade ótica.

#### 4.5 - Avaliação do desempenho dos protótipos

##### 4.5.1 - Fase I

Na avaliação sorológica das 301 amostras do painel de soros usados nesta fase (98 consenso positivo e 203 consenso negativo), os seguintes resultados foram obtidos para o protótipo 1: 95 positivos (índice de reatividade  $> 1.0$ ) e 3 negativos (falsos-negativo) para as amostras consenso positivo. Das amostras do consenso



negativo, 202 apresentaram resultado negativo (índice de reatividade < 1.0) e apenas 1 resultado positivo (falso-positivo) na faixa cinza (índice de reatividade  $\geq 1.0 \leq 1.2$ ), achados que se repetiram em outros dois ensaios com esse protótipo (Figura 4.14 e Tabela 4.1).

**Quadro 4.1 – Resultados obtidos na validação dos controles nos protótipos 1, 2 e 3. Os cálculos da média e desvio padrão foram obtidas por meio do programa microsoft® excel 2002.**

Controle	D.O Protótipo 1	D.O Protótipo 2	D.O Protótipo 3
<b>Soro anti-CRA</b>	1,503	0,787	1,559
	1,432	0,748	1,673
	1,479	0,783	1,529
	1,537	0,849	1,522
	1,359	0,813	1,434
	1,364	0,792	1,393
	1,495	0,883	1,528
	1,509	0,727	1,497
	1,268	1,059	1,361
	1,11	0,836	1,518
	1,28	0,783	1,466
	1,32	0,799	1,424
	<b>Média /Desvio</b>	<b>1,388 / 0,123</b>	<b>0,822 / 0,082</b>
<b>Soro anti-FRA</b>	1,747	1,02	1,557
	1,735	0,98	1,753
	1,739	1,106	1,720
	1,785	1,079	1,384
	1,784	1,081	1,596
	1,715	1,015	1,590
	1,805	1,104	1,614
	1,759	1,346	1,665
	1,629	1,035	1,582
	1,649	1,182	1,457
	1,689	1,099	1,449
	1,577	1,077	1,580
<b>Média /Desvio</b>	<b>1,718 / 0,067</b>	<b>1,094 / 0,091</b>	<b>1,586 / 0,107</b>
<b>Controle Negativo</b>	0,091	0,085	0,091
	0,085	0,095	0,056

	0,096	0,083	0,064
	0,091	0,103	0,063
	0,098	0,082	0,063
	0,101	0,093	0,07
	0,095	0,087	0,064
	0,105	0,097	0,064
	0,102	0,084	0,07
	0,111	0,112	0,07
	0,092	0,091	0,068
	0,148	0,11	0,066
	0,097	0,093	0,089
	0,11	0,174	0,067
	0,107	0,102	0,068
	0,096	0,115	0,064
	0,108	0,105	0,077
	0,105	0,117	0,065
	0,11	0,098	0,07
	0,097	0,102	0,065
	0,096	0,086	0,068
	0,103	0,103	0,076
	0,124	0,091	0,068
	0,147	0,11	0,08
<b>Média /Desvio</b>	<b>0,107 / 0,015</b>	<b>0,100 / 0,018</b>	<b>0,069 / 0,007</b>

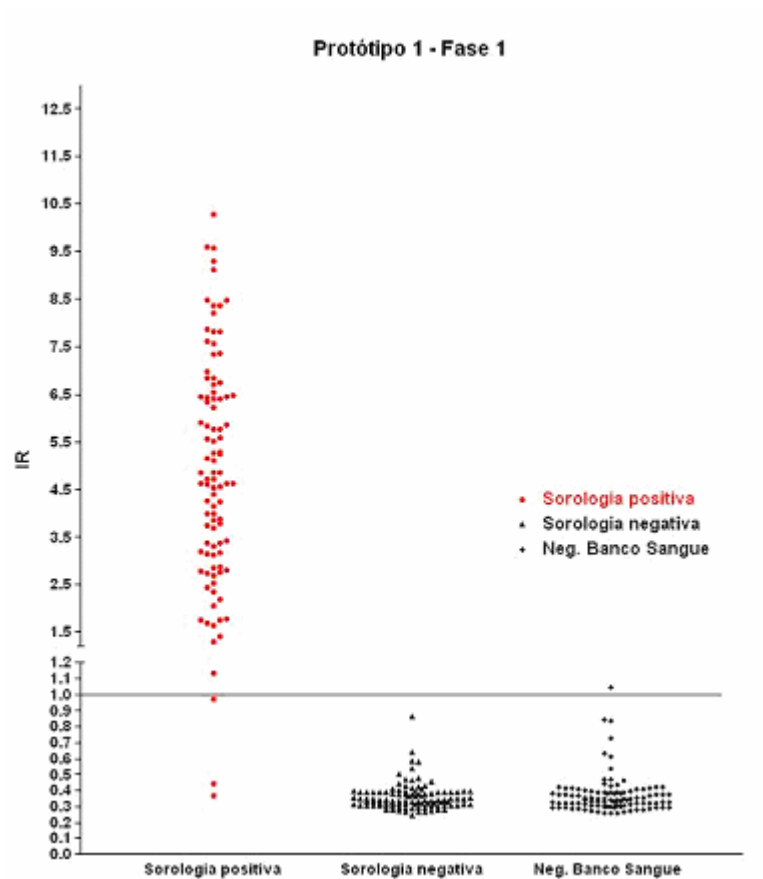


Figura 4.14 – Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 1 da fase I. A linha no interior da distribuição dos pontos representa o limiar de reatividade. A faixa cinza corresponde ao valor de IR entre 1 e 1,2. (•) Amostras do consenso positivo; (▲) Amostras consenso negativo; (◆) Amostras consenso negativo, oriundas dos serviços de hemoterapia do país.

**Tabela 4.1 – Desempenho do protótipo 1 na fase I de avaliação.**

<b>Protótipo 1</b>		
Resultados	Consenso Positivo <sup>a</sup>	Consenso Negativo <sup>b</sup>
Positivos	95	1
Negativos	3	202
Sensibilidade	96,9	-
Especificidade	-	99,5

VPP(Valor Preditivo Positivo): 99%; VPN (Valor Preditivo Negativo): 98,5%; a:n=98 e b:n=203

Nos ensaios realizados com o protótipo 2 foram obtidos os seguintes resultados: 57 positivos (índice de reatividade > 1.0) e 41 negativos (falsos-negativos) para as amostras consenso positivo. Das amostras do consenso negativo, todas apresentaram resultado negativo (índice de reatividade < 1.0) (Figura 4.15 e Tabela 4.2).

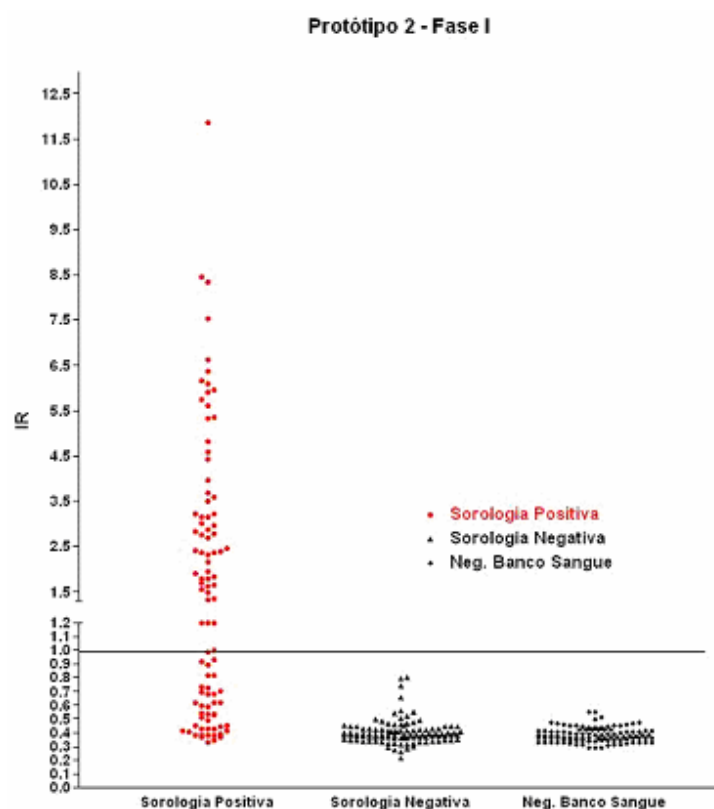


Figura 4.15 – Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 2 da fase I. A linha no interior da distribuição dos pontos representa o limiar de reatividade. A faixa cinza corresponde ao valor de IR entre 1 e 1,2. (•) Amostras do consenso positivo ; (▲) Amostras consenso negativo; (◆) Amostras consenso negativo, oriundas dos serviços de hemoterapia do país.

**Tabela 4.2 – Desempenho do protótipo 2 na fase I de avaliação.**

<b>Protótipo 2</b>		
Resultados	Consenso Positivo <sup>a</sup>	Consenso Negativo <sup>b</sup>
Positivos	57	0
Negativos	41	203
Sensibilidade	58,2	-
Especificidade	-	100

VPP: 100%; VPN: 83,2%; a:n=98 e b:n=203

Com protótipo 3 foram obtidos os seguintes resultados: 97 positivos (índice de reatividade  $> 1.0$ ) e 1 negativo (falso-negativo) para as amostras do consenso positivo. Quanto ao consenso negativo, 202 amostras apresentaram resultado negativo (índice de reatividade  $< 1.0$ ) e apenas 1 foi positiva (falso-positivo) na faixa cinza (índice de reatividade  $\geq 1.0 \leq 1.2$ ), encontram-se resultados que se repetiram em outros dois ensaios realizados com esse protótipo (Figura 4.16 e Tabela 4.3).

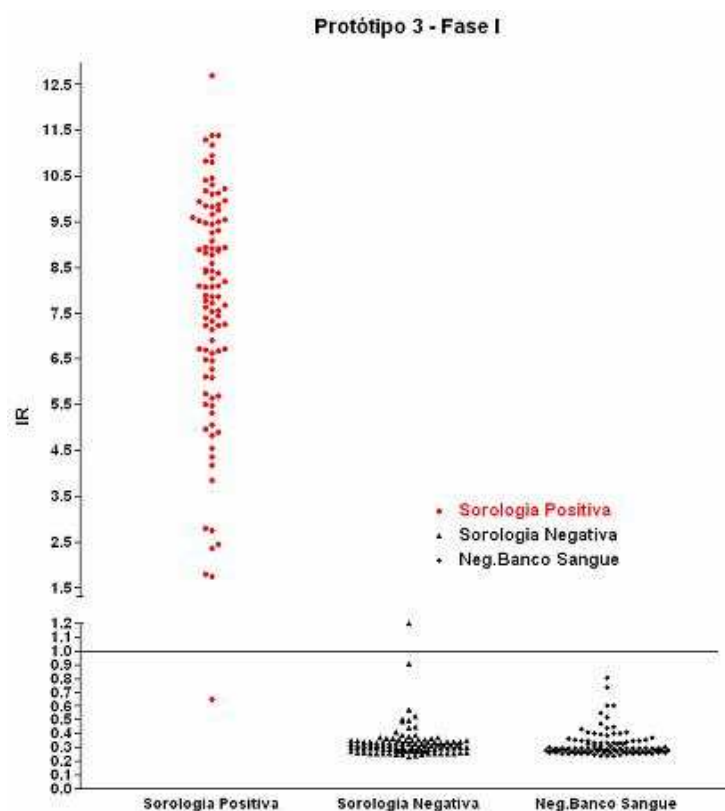


Figura 4.16 – Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 3 da fase I. A linha no interior da distribuição dos pontos representa o limiar de reatividade. A faixa cinza corresponde ao valor de IR entre 1 e 1,2. (•) Amostras do consenso positivo ; (▲) Amostras consenso negativo; (◆) Amostras consenso negativo, oriundas dos serviços de hemoterapia do país.

**Tabela 4.3 – Desempenho do protótipo 3 na fase I de avaliação.**

<b>Protótipo 3</b>		
Resultados	Consenso Positivo <sup>a</sup>	Consenso Negativo <sup>b</sup>
Positivos	97	1
Negativos	1	202
Sensibilidade	99	-
Especificidade	-	99,5

VPP: 99%; VPN: 99,5%; a:n=98 e b:n=203

Os protótipos 1 e 3 apresentaram 99,5% (IC 95%:93,5-99,9%) de especificidade (Tabelas 4.1 e 4.3) e o protótipo 2, 100% (IC 95%:97,7-100%) (Tabela 4.2). A sensibilidade do protótipo 3 foi 99% (IC 95%:93,9-99,9%), do protótipo 1 foi 96,9% (IC 95%:90,7-99,2%) enquanto que a do protótipo 2 foi 58,2% (IC 95%:47,8%-67,9%) (Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3).

#### **4.5.2 - Fase II**

Na avaliação sorológica das 211 amostras do painel selecionado para esta fase (143 do consenso positivo e 68 do consenso negativo), os seguintes resultados foram obtidos para o protótipo 1: 135 positivos (índice de reatividade > 1.0) e 08 negativos (falso-negativos) para as amostras do consenso positivo e 68 negativos (índice de reatividade < 1.0) para as amostras do consenso negativo (Figura 4.17 e Tabela 4.4).

No protótipo 2 foram observados 79 resultados positivos (índice de reatividade > 1.0) e 64 negativos (falso-negativos) para as amostras do consenso positivo. Na avaliação das amostras do consenso negativo, 68 apresentaram resultado negativo (índice de reatividade < 1.0) (Figura 4.18 e Tabela 4.5).

No protótipo 3 obtivemos 137 resultados positivos (índice de reatividade > 1.0) e 06 negativos (falso-negativos) para as amostras do consenso positivo. Das amostras consenso negativo, 68 apresentaram resultado negativo (índice de reatividade < 1.0) (Figura 4.19 e Tabela 4.6).

Na fase II, os protótipos 1, 2 e 3 apresentaram 100% (IC 95%:93,3-100%) de especificidade (Tabelas 4.4, 4.5 e 4.6). A sensibilidade do protótipo 1 foi 94,4% (IC 95%:88,9-97,4%), do protótipo 2 foi 55,2% (IC 95%:46,7-63,5%) enquanto que a do protótipo 3 foi 95,8% (IC 95%:90,7-98,3%) (Tabelas 4.4, 4.5 e 4.6).

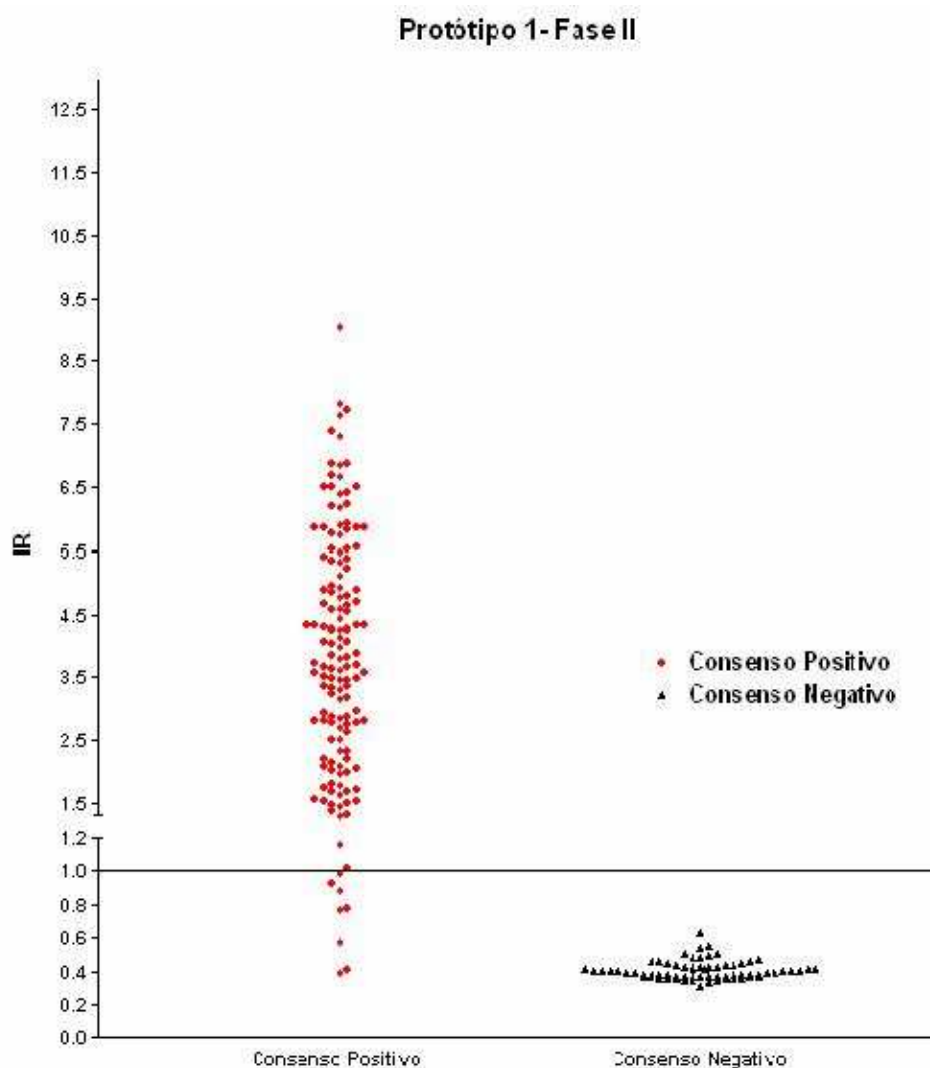


Figura 4.17 – Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 1 da fase II. A linha no interior da distribuição dos pontos representa o limiar de reatividade. A faixa cinza corresponde ao valor de IR entre 1 e 1,2. (●) Amostras do consenso positivo ; (▲) Amostras consenso negativo.



Tabela 4.4 – Desempenho do protótipo 1 na fase II de avaliação.

Protótipo 1		
Resultados	Consenso Positivo <sup>a</sup>	Consenso Negativo <sup>b</sup>
Positivos	135	0
Negativos	08	68
Sensibilidade	94,4%	-
Especificidade	-	100%

a:n=143 e b:n=68 VP: 89,5%; VPP: 100%;

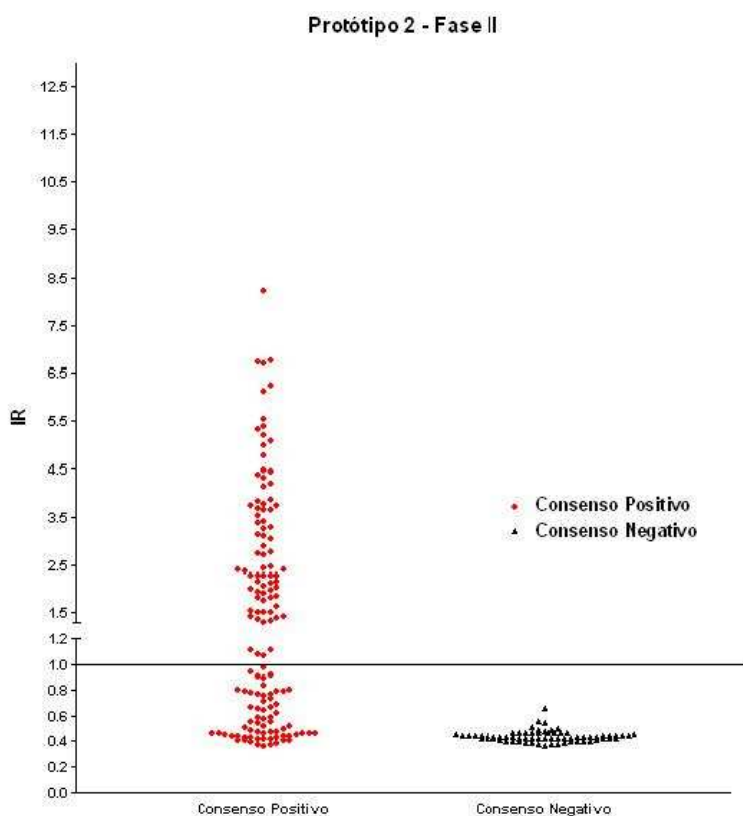


Figura 4.18 – Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 2 da fase II. A linha no interior da distribuição dos pontos representa o limiar de reatividade. A faixa cinza corresponde ao valor de IR entre 1 e 1,2. (•) Amostras do consenso positivo ; (▲) Amostras consenso negativo.

Tabela 4.5 – Desempenho do protótipo 2 na fase II de avaliação.

Protótipo 2		
Resultados	Consenso Positivo <sup>a</sup>	Consenso Negativo <sup>b</sup>
Positivos	79	0
Negativos	64	68
Sensibilidade	55,2%	-
Especificidade	-	100%

VPP: 100%; VPN: 51,5%; a:n=143 e b:n=68

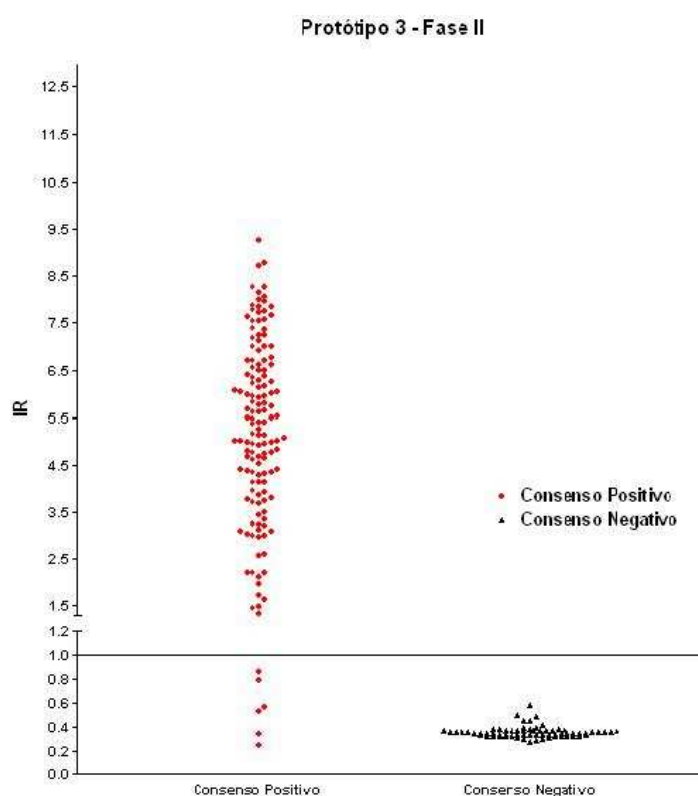


Figura 4.19 – Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 3 da fase II. A linha no interior da distribuição dos pontos representa o limiar de reatividade. A faixa cinza corresponde ao valor de IR entre 1 e 1,2. (●) Amostras do consenso positivo ; (▲) Amostras consenso negativo.

**Tabela 4.6 – Desempenho do protótipo 3 na fase II de avaliação.**

Protótipo 3		
Resultados	Consenso Positivo <sup>a</sup>	Consenso Negativo <sup>b</sup>
Positivos	137	0
Negativos	06	68
Sensibilidade	95,8%	-
Especificidade	-	100%

VPP: 100%; VPN: 91,9%; a:n=144 e b:n=68

Com relação a análise das 87 amostras de soro de indivíduos portadores de outras doenças infecciosas e parasitárias observou-se, reatividade em quatro amostras (Tabela4.7).

**Tabela 4.7 – Reatividade das amostras com outras patologias**

Amostra	Patologia	Protótipo 1	Protótipo 2	Protótipo 3
34	HIV	R	R	R
385	Leishmaniose Tegumentar	R	R	R
388	Leishmaniose Tegumentar	NR	R	NR
156	Sífilis	NR	R	NR

[R: Reativo; NR: Não reativo].

### 4.5.3 - Fase III

Devido a indisponibilidade de volume das amostras seleccionadas para esta fase e pelo argumento do melhor desempenho nas fases I e II, avaliamos o painel seleccionado a fase III somente com o protótipo 3.

Na avaliação sorológica das 58 amostras do painel de soros desta fase (29 do consenso positivo e 29 do consenso negativo), os seguintes resultados foram obtidos para o protótipo 3: 29 resultados positivos (índice de reatividade > 1.0) para as amostras do consenso positivo e 29 resultados negativos (índice de reatividade < 1.0) para as amostras do consenso negativo (Figura 4.20).

O protótipo 3 apresentou 100% (IC 95%:85,4-100%) de sensibilidade e especificidade (Tabela 4.8).

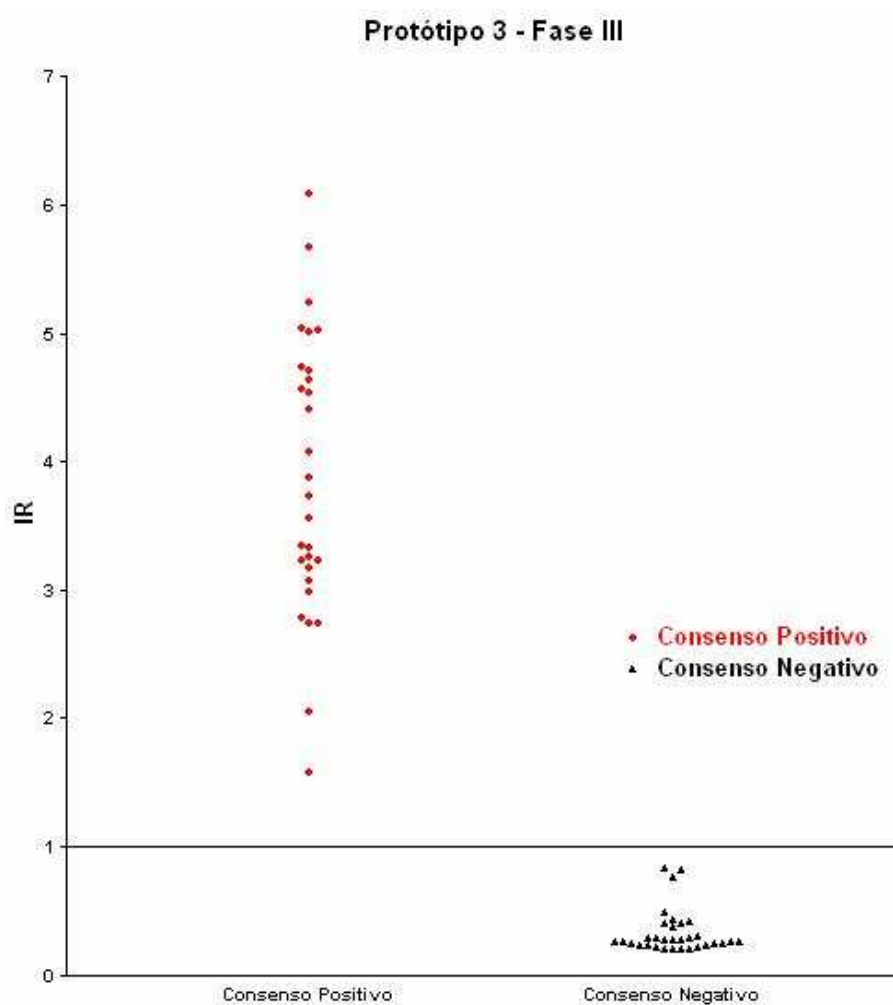


Figura 4.20 – Índice de Reatividade das amostras analisadas no protótipo 3 da fase III. A linha no interior da distribuição dos pontos representa o limiar de reatividade. A faixa cinza corresponde ao valor de IR entre 1 e 1,2. (•) Amostras do consenso positivo ; (▲) Amostras consenso negativo.

**Tabela 4.8 – Desempenho do protótipo 3 na fase III de avaliação.**

<b>Protótipo 3</b>		
<b>Resultados</b>	<b>Consenso Positivo<sup>a</sup></b>	<b>Consenso Negativo<sup>b</sup></b>
Positivos	29	0
Negativos	0	29
Sensibilidade	100	-
Especificidade	-	100

VPP: 100%; VPN: 100%; a:n=29 e b:n=29

## 5 – DISCUSSÃO

Apesar dos avanços obtidos no controle da transmissão natural da doença de Chagas esta continua sendo um importante problema de Saúde Pública. A qualidade do diagnóstico laboratorial dessa doença ainda é baixa e isso contribui para a dificuldade na identificação dos indivíduos a serem tratados ou para a liberação de sangue com fins transfusionais e também quanto à eficácia das medidas a serem adotadas para diminuir a transmissão da infecção. A detecção de anticorpos anti-*T.cruzi* na investigação sorológica é o método de escolha para o diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica, considerando-se a especificidade e sensibilidade dos testes utilizados em análise clínica de rotina (Gomes, 1996; Luquetti & Rassi, 2000; Barrett et al, 2003).

Esses métodos são limitados devido ao uso de misturas complexas de antígenos naturais brutos ou semipurificados e podem permitir a evidenciação de reações cruzadas em pacientes com outras parasitoses, como as leishmanioses, ou a presença de autoanticorpos. Com relação aos resultados falso-positivos há que se considerar também falhas envolvendo a padronização de reagentes e a diversidade de procedimentos técnicos (Carrasco et al., 1985; Oelemann et al., 1998; Gomes et al., 2004), além das implicações causadas por sua ocorrência (Furuchó et al, 2008).

Em um estudo multicêntrico, realizado no Brasil em 2005, foram avaliados 12 kits comerciais para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas que utilizam antígenos complexos e/ou purificados do parasito. Os resultados mostraram que os níveis de sensibilidade variaram de 97% a 100% e os níveis de especificidade de 60 a 100%. Em vista disso, o Ministério da Saúde determinou que para uma amostra ser considerada positiva, ela deve resultar do consenso de uma avaliação com dois Kits de metodologias distintas (Ministério da Saúde, 2006), dentre os seguintes testes: a hemaglutinação indireta (HAI), a imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (EIE). Na triagem sorológica, a recomendação para a

liberação de bolsas de sangue para a Hemorrede, baseada na RDC N°153 (Ministério da Saúde, 2004) é a realização de testes imunoenzimáticos de alta sensibilidade. A prevalência de amostras soropositivas em bancos de sangue da Argentina, do Brasil e do Chile, caiu de 5-25% na década de 80 para 1-5% nos anos 90 (Lunardelli et al., 2007).

No Brasil e em outras regiões em que a endemia encontra-se sob controle, reações indeterminadas representam, freqüentemente, mais de 50% das inaptidões sorológicas para a doença de Chagas em bancos de sangue e, não raramente, são superiores a 80%. Salles et al (1996) demonstraram que 6.915 doadores que apresentaram positividade dentre os 411.617 testados sorologicamente na Fundação Pró-Sangue de São Paulo, por meio de três diferentes técnicas, 69,9% foram inconclusivos em seu resultado. Dados da Gerência Geral de Sangue da ANVISA/MS demonstraram em 2002, prevalência da inaptidão sorológica para o *T. cruzi* igual a 0,6% (ANVISA, 2004). No Brasil, estimando-se em 60% a ocorrência de reações indeterminadas nas três milhões de doações anuais, das quais 0,6% das bolsas coletadas são inaptas sorologicamente, podemos calcular que, em média, um total de 10.800 bolsas serão descartadas. Esses valores refletem a baixa especificidade dos testes sorológicos utilizados nos serviços de Hemoterapia do país (Salles et al.,1996; Souza et al., 2006). Esta situação procuramos minimizar com a re-padronização do EIE Recombinante para o diagnóstico da doença de Chagas que apresentou em nosso estudo elevados níveis de sensibilidade e especificidade.

A Hemorrede encontra-se diante de uma condição em que um número relativamente grande de pessoas apresentam resultados positivos para a doença de Chagas em testes realizados quando de uma doação de sangue. Esses indivíduos precisam ser encaminhados para serviços de referência, onde serão submetidos a uma bateria de exames clínicos e laboratoriais, que muitas vezes descartam a infecção, mas geram ansiedade para os pacientes e sobrecarga para o SUS, além de custos importantes (Souza, 2006).

Para superar os problemas observados nos testes sorológicos convencionais, diversos grupos de pesquisa vêm buscando alternativas para aumentar a especificidade desses testes, promovendo a substituição dos antígenos brutos por peptídeos sintéticos, além do uso de antígenos, produzidos pela tecnologia de DNA recombinante, em diversas plataformas (Umezawa & Silveira, 1999; Silveira et al, 2001; Cooley et al., 2008). Tal fato teve início a partir da construção de bibliotecas genômicas, obtidas com fragmentos de DNA do *T. cruzi*, sendo possível a escolha

de genes que codificam antígenos de elevada reatividade com soros de pacientes na fase crônica da doença (Laffaille et al., 1989)

Os antígenos recombinantes, produtos de genes clonados são bastante específicos. Apesar de isolados por diferentes grupos, são muitas vezes próximos ou mesmo, praticamente idênticos (homólogos), embora com designações diferentes. Este é o caso das proteínas CRA e FRA, alvos do presente estudo, e que são, respectivamente, homólogas aos antígenos AG30, JL8,TC27 e aos antígenos AG1, JL7 e H49 (Ibanez et al.,1988; Silveira et al., 2001).

A tendência de utilizar misturas de proteínas recombinantes como o CRA + FRA e JL8 + MAP, em proporções variáveis, têm melhorado a sensibilidade dos testes (Krieger et al.,1992; Umezawa et al., 2004). As proteínas recombinantes possuem polimorfismos e alguns soros podem não apresentar uma reação positiva para elas individualmente, mas ao misturá-las, aumenta-se a capacidade de detecção de soros de indivíduos chagásicos, permitindo uma clara distinção entre os soros próximos ao CO ou amostras *borderline*, dos soros negativos (Krieger et al.,1992; Carvalho et al., 1993). A mistura dos recombinates JL8 + MAP demonstrou ser bem útil ao imunodiagnóstico de fase aguda e crônica da doença de Chagas, com valores de especificidade superiores aos encontrados nos ensaios convencionais que utilizam antígenos inteiros ou semipurificados de frações oriundas de epimastigotas de *T. cruzi* (Umezawa et al., 2004)

Ao iniciarmos nosso projeto tínhamos disponíveis oito construções de proteínas recombinantes CRA e FRA expressas com peptídeos (cauda de Histidina) ou proteínas de fusão ( $\beta$ -gal ou Glutathione-S-Transferase), e a partir desse material foi possível definir três modelos de protótipos com variações entre eles, na apresentação das proteínas recombinantes, tanto na forma de antígeno quanto na forma de conjugado. A definição do formato e a padronização dos protótipos objetivavam ampliar, sobretudo, os níveis de sensibilidade, além da busca de viabilidade técnica e de produção.

A escolha destes formatos foi motivada pela possibilidade de termos processos de purificação menos complexos e reduzidos, excluindo a necessidade de se obter três crescimentos de proteínas recombinantes e três processos de purificação distintos para cada um. Sendo assim, o protótipo 1 seria o mais complexo, visto que temos três construções envolvidas em seu processo. Já o protótipo 3 agrega a vantagem de se trabalhar com duas construções.



Outro ponto importante que levamos em consideração na escolha dos três formatos diz respeito à temperatura de conservação (2 a 8°C) e sobretudo sua adequação aos requisitos de aceitação dos usuários excluindo-se a padronização com temperatura de conservação -20°C, como o kit anteriormente registrado, eliminando a necessidade de freezers e possibilitando a automação dos mesmos

A avaliação dos protótipos frente a amostras e painéis de referência da primeira fase demonstrou melhor desempenho do protótipo 3 quanto aos níveis de sensibilidade (99%) em relação ao protótipo 1 (96,9%) e ao 2 (58,2%). Quanto ao parâmetro especificidade, tanto o protótipo 1 quanto o 3, apresentaram valores iguais a 99,5% e o protótipo 2 valores de 100%. Os resultados da segunda fase indicaram sensibilidade dos protótipos 1 (94,4%), 2 (55,2%) e 3 (95,8%) inferiores às observadas na primeira fase. O desempenho do protótipo 3 foi superior na terceira fase na qual os valores de sensibilidade e especificidade foram iguais a 100%. Embora não tenha sido possível avaliar um número maior de amostras, estas apresentavam uma caracterização parasitológica bem definida, confirmando a viabilidade técnica do protótipo 3 quanto aos parâmetros sensibilidade e especificidade.

Relacionando a reatividade apresentada na avaliação dos três protótipos com 87 amostras de indivíduos com outras patologias tais como, HIV, leishmaniose Tegumentar, leishmaniose Visceral, HTLV, e hepatites, apenas duas dessas amostras apresentaram reação nos três protótipos. Entretanto, não foi possível precisar se houve falha do teste por indisponibilidade de volume para realizar a repetição dos testes e uma melhor caracterização destas amostras. Alguns autores que fizeram análises anteriores semelhantes, relataram não ter havido cruzamento na resposta do *Kit* EIE Recombinante Chagas anterior, com outras patologias (Gomes et al., 2001; Silva, 2003; Gadelha et al., 2003).

O protótipo 3 foi aquele que apresentou os melhores resultados nas três fases de avaliação, além de constituir um modelo extremamente viável sob o ponto de vista produtivo pois utiliza apenas duas construções (CRA&FRA-GST; Histidina-CRA&FRA) ao contrário do Kit EIE Recombinante Chagas anterior, que englobava três construções (CRA&FRA-GST; CRA- $\beta$ gal; FRA- $\beta$ gal) em seu processo de produção. O desempenho do protótipo 2 com relação ao parâmetro sensibilidade (58,2% na fase I e 55,2% na fase II), invalidou a possibilidade de sua utilização como produto, muito embora tenha apresentado elevada especificidade (100% nas

duas fases) e sob o ponto de vista produtivo fosse ideal por usar apenas uma construção.

Comparativamente à outras avaliações de ensaios que utilizam antígenos recombinantes na sua composição, o ensaio Immunodot (Dia Kit Bio-Chagas assay®) apresentou níveis de sensibilidade de 99,6% e 99,1% de especificidade, o Imunoensaio em linha (INNO-LIA®Chagas Ab), sensibilidade de 100% e 99,3% de especificidade, o ensaio imunoenzimático (Mix-ELISA): sensibilidade de 99,7% e 99,5% de especificidade e por fim, o ensaio quimioluminescente (PRISMChagas) com 100% de sensibilidade e 99,94% de especificidade. O protótipo 3 desenvolvido no presente projeto apresentou resultados comparáveis (Sensibilidade fase I: 99%; Fase II: 95,8% e fase III: 100%) quanto a esses parâmetros, em relação aos testes acima citados, embora tenhamos usado um quantitativo menor de amostras.

O aparecimento de resultados falso-negativos não é inesperado e já foi relatado em pequena proporção (<2%) em muitas avaliações utilizando misturas de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos. Em nosso estudo observamos a ocorrência de uma amostra com resultado falso-negativo na fase I, seis amostras na fase II e nenhuma na fase III, quando da avaliação do protótipo 3. Esses resultados podem estar relacionados à variações individuais na resposta imune dos indivíduos em virtude do histórico genético ou de exposição à doença. Não se pode deixar de considerar a diversidade genética de cepas infectantes do *T. cruzi* em função do seu polimorfismo e da variada circulação de cepas do parasito em diferentes áreas, fato verificado com as amostras da fase II (Umezawa et al., 2003).

Diante dos resultados apresentados pelo protótipo 3 (antígeno: CRA&FRA-GST; Conjugado: Histidina-CRA&FRA) nas avaliações de desempenho ao longo deste estudo, definimos este modelo como o mais adequado para substituir o *Kit* EIE Recombinante Chagas com viabilidade técnica de produção e conservação.

As perspectivas de uso do protótipo 3 são altamente promissoras, uma vez que, podemos considerar a prova de conceito concluída. As etapas até aqui definidas não permitem qualificá-lo ainda como um produto, sendo necessário envolver outros setores de Bio-Manguinhos, especialmente técnicos de produção, controle e garantia de qualidade, engenharia industrial e relações com o mercado. Desta forma será possível avançar nas etapas de um plano de trabalho que contemple a obtenção de três lotes pilotos, realização de controle de qualidade, formato final de apresentação do Kit, atualização dos estudos de viabilidade técnica

e econômica, realização de estudos de validação e multicêntrico, para permitir a elaboração de documentação técnica para solicitar o registro junto a ANVISA.

As proteínas recombinantes purificadas e caracterizadas CRA e FRA poderão ser objeto de estudos futuros visando o desenvolvimento de testes diagnósticos usando novas plataformas como os microarranjos líquidos, testes rápidos com base nas metodologias de imunocromatografia e fluxo lateral simples ou de duplo percurso (DPP®).

## 6 - CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos após as etapas de padronização de um EIE Recombinante para o diagnóstico da doença de Chagas, concluímos que:

- 1) Foram expressas, purificadas e conjugadas proteínas recombinantes envolvidas na elaboração dos protótipos e de utilidade para futuros estudos envolvendo outras plataformas;
- 2) Foram padronizados três modelos de protótipos com variações das proteínas recombinantes como antígeno e como conjugado, capazes de serem usados no estabelecimento de um ensaio imunoenzimático para a doença de Chagas;
- 3) Foram realizadas avaliações do desempenho e calculados os valores de sensibilidade, a especificidade, o VPP e o VPN, em três fases, com grupos de amostras diferentes em cada fase. Nas três avaliações, o protótipo 3 apresentou o melhor desempenho em relação aos demais quanto aos níveis de sensibilidade e especificidade;
- 4) Em nosso estudo ficou evidente a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento de reativos biológicos de uso em diagnóstico, como os EIE, de maneira a atender as necessidades dos serviços de hemoterapia, com a produção de kits de elevada sensibilidade e especificidade.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affranchino JL, Ibañez CF, Luquetti AO, Rassi A, Beyes MB, Macina RA et al. **Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease.**1989. *Mol Biochem Parasitol*; 34: 221-228.

Albuquerque RDR, Fernandes LAR, Fynaiama GK, Ferriolli Filho F, Siqueira AF. **Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes com reação de Guerreiro-Machado positiva.** Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.1972;14:1-5

Almeida E, Krieger MA, Carvalho MR, Oelemam W, Goldemberg S. **Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease and blood bank screening.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.1990; 85(4):513-517.

ANVISA. **Relatório de produção da hemorrede em 2002: perfil sorológico dos doadores.**Disponível em: <[HTTP://www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) - acesso em 10 março 2004.

Barrett MP, Burchmore RJS, Stich A, Lazzarijo JO, Frasch AC, Cazzulo JJ. **The trypanosomiasis.** The lancet. 2003; 362: 1469-1480

Bonametti AM, Filho AC, Ramos LR, Baldy JLS, Matsuo T. **Infecção por *T.cruzi* em candidatos a doador de sangue.** Rev. Saúde Pub. 1998; 32(6): 566-571.

Borges-Pereira J, Castro JAF, Campos JHF, Nogueira JS, Zauza PL, Marques P et al. **Estudo da infecção e morbidade da doença de Chagas no município de João Costa, Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.** Rev.Soc.Bras.Med.Trop. 2002; 35(4): 315-322.

Brener Z. ***Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo**. In: JC Pinto Dias, JR Coura, Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. 1997. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro; p29-32.

Britto C, Cardoso MA, Monteiro VCM, Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS. **Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation**. Parasitol. 1995(a);110:241-247.

Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JR et al. ***Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast dna and nonradioactive hybridization**. Exp. Parasitol. 1995 (b); 81:462-471.

Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macêdo V et al. **Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001;96:1-4.

Broadsky CI & Barral-Neto M. **Resposta Imune na doença de Chagas**. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e doença de chagas. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000; p.170-176.

Camargo ME, Amato-Neto V. **Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection**. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 1974;16: 200-202.

Camargo ME, Souza SL. **The use of filter paper blood smears in practical fluorescent test for American Trypanosomiasis serodiagnostic**. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 1966; 8:255-258.

Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Assuda SY, Ferreira AW. et al. **Chagas' disease diagnosis: Evaluation of different tests in blood bank screening**. Transfusion. 1993; 33(10):830-834.

Carrasco RL, Breniere SF, Poch O, Miguez HV, Selaes H, Antezana G et al. **Chagas' serology and its problems.** Ann. Soc. Belg Med trop.1985; 65: 79-84.

Cerisola JA, Chaben MF, Lazzari JO. **Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.** 1962. Prensa Médica Argentina; 49: 1761-1767.

Chagas C. **Aspecto clínico da nova entidade morbida produzida pelo *Schizotrypanum cruzi*:** Nota prévia: Brazil-Médico. 1910; 24(27): 263-265.

Chang CD, Cheng KY, Jiang LX, Salbilla VA, Haller AS, Yem AW et al. **Evaluation of a prototype *Trypanosoma cruzi* antibody assay with recombinant antigen on a fully automated chemiluminescence analyser for blood donor screening.** Transfusion. 2006; 46: 1737-1744.

Cooley G, Etheridge RD, Boehlke C, Bundy B, Weatherly DB, Minning T. **High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection.** PloS Negl. Trop. Dis.2008; 2(10): 1-13.

Coura JR, Castro SL. **A critical review on Chagas' disease chemotherapy.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz.2002; 97(1): 3-24

Coura JR. **Tripanossomose, Doença de Chagas.** Endemias. Ver. Soc. Brás. Progr. Ciência. 2003; 55 (11): 30-33.

Coura JR. **Transmissão da infecção chagásica por via oral na história natural da Doença de Chagas.** Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2006. 39;(III): 113-117.

Coura JR. **Chagas' disease: what is known and what is needed – A background article.** Memórias Instituto Oswaldo Cruz. 2007. 102; (I): 113-122.

Davis DR, Padlan EA, Sheriff S. **Antibody-antigen complexes.** Annu Rev Biochem,1990;59,439-473.

Dias JCP. **Epidemiologia**. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-neto M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000; p.48-71.

Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. **The impact of Chagas' disease control in Latin America**. Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 2002; 97(5):603-612.

Engvall E, Perlmann P. **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G**. Immunochemistry. 1971;8:871-874.

Ferreira AW, Ávila SLM. **Doença de Chagas**. In: Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001: 241-249.

Ferreira MU, Foronda AS, Schumaker TTS. **Trypanossoma cruzi e a doença de Chagas**. In:Ferreira UM, Foronda AS, Schumaker TTS .Fundamentos biológicos da parasitologia humana. 1ed. São Paulo: Manole; 2003: 37-46.

Ferreira JLM, Silva TPT. **Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo triatoma infestans no Brasil**. Um fato histórico. Rev. Soc. Bras. Méd.Trop. 2006;39(5):507-509

Frasch ACC. **Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in T. cruzi**. Parasitology Today. 2000; 16(7):282-286.

Furuchó CR, Umezawa ES, Almeida I, Freitas VL, Bezerra R, Nunes EV et al. **Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood Banks: evaluation of cellular and humoral response**. Trop.Med.and Inter. Health. 2008: 13(12): 1527-1533.

Gadelha AA, Vercosa AF, Lorena VM, Nakazawa M, Carvalho AB, Souza WV et al. **Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test**. Vox Sang. 2003 Oct; 85(3):165-70.



Gascón J, Albajar P, Canãs, Flores M, Prat JGI, Herrera RN et al. **Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *T.cruzi* infection is not endemic.** Rev. Esp.Cardiol. 2007; 60(3): 285-293.

Gomes YM. **Diagnóstico Etiológico.** In: Doença de Chagas. Malta J.(Organizador), Sarvier, Rio de Janeiro; 1996.cap. VII, p. 119 – 132.

Gomes YM. **PCR and Sero-diagnosis of chronic Chagas' disease.** Biotechnological advances. Appl. Biochem. Biotech. 1997; 66:119.

Gomes ML, Macedo AM, Vago A, Pena SDJ, Galvão LMC, Chiari E. ***Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood.**Exp.Parasitol.1998; 88: 28-33.

Gomes YM, Pereira VR, Nakazawa M, Rosa DS, Barros MNDS, Ferreira AGP et al. **Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001 May; 96(4): 497-501.

Gomes YM, Pereira VRA, Krieger MA, Goldenberg, S. **Emprego do kit EIE-Recombinante-Chagas-Bio-Manguinhos no diagnóstico da doença de Chagas crônica.** *Salud y Ciencia.* 2004; (1):1:10.

Hoare CA, Wallace FG. **Developmental stages of Trypanosomatid flagellates: a new terminology.** *Nature.*1966; 212:1385-1386.

Ibanez CF, Affranchino JL, Macina RA, Reyes MB, Lequizamon S, Camargo S et al. **Multiple *T. cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs.** *Mol.Biochem.Parasitol.*1988; 30:27-34.

Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. **Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*.** *J.Clin.Microbiol.*1996; 34 (5): 1171-1175.

Kolosova AY, Shim WB, Yang ZY, Eremin SA, Chung DH. **Direct competitive ELISA base don monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples.** Anal Bioanal.Chem.2006; 384: 286-294.

Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Laffaille JJ, Pereira JB, Krieger H et al. **Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas´disease.** Am J Trop Med Hyg .1992;46: 427-434.

Krieger MA, Salles JM. Almeida E, Linss J, Bonaldo MC, Goldemberg S. **Expression and polymorphism of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a cytoplasmatic repetitive antigen.** Experimental Parasitology. 1990; 70(3): 247-254.

Lana M, Tafuri WL. ***Trypanossoma cruzi*.** In: Neves DP et al. Parasitologia humana. 1995. 9 ed. São Paulo. Atheneu. Cap 10: 82-114

Lafaille JJ,Linss J, Krieger MA, Padron TS, Souza W, Goldemberg S. **Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins with repetitive epitopes.**Molecular and Biochemical Parasitology.1989;35: 127-136.

Lewinshohn R. **The discovery of *Trypanossoma cruzi* and of American tripanosomiasis.** Trans. R.Soc.Trop.Med.Hyg.1979; 73(5):513-523.

Lunardelli A, Borges FP, Mello KF, Zeferino ASA. **Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue.** RBAC.2007;39(2):139-141.

Luquetti AO. **Evolution of Knowledge on the etiological diagnosis of chagasic infection.** Memórias Instituto Oswaldo Cruz.1999;94(I):283-284.

Luquetti AO & Rassi A. **Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.**In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000; p 344-378.

Martin D, Tarleton R. **Generation, specificity and function of CD8+ T cells in *T. cruzi* infection.** Immunol. Rev.2004; 201:304-317.

Markell EK, John DT, Krotoski WA. **Parasitologia Médica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003: 136-149.

Maslov D, Podlipaev SA, Lukes J. **Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into evolution of parasitism**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001; 96(3):397-402.

Medronho RA, Perez MA. **Testes diagnósticos**. In: Medronho RA, Carvalho DM, Luiz RR, Werneck GL.. Epidemiologia. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2002; p.259-270

Ministério da Saúde: Regulamento Técnico para os Serviços de Hemoterapia, **Portaria 1376**, DOU, 19 de Novembro de 1993.

Ministério da Saúde: Regulamento técnico para o registro de produtos para diagnóstico de uso *in vitro* na Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria 08**, DOU, 23 de janeiro de 1996.

Ministério da Saúde. **Diagnóstico Sorológico do HIV** – Testes de triagem. Programa nacional de doença sexualmente transmissíveis e AIDS. Série TELELAB. Brasília. 1997. 67p.

Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Doença de Chagas. **Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública**. Série TELELAB. Brasília. 1998; 71p.

Ministério da Saúde: **Resolução Da Diretoria Colegiada N°343** ANVISA. DOU, 13 de Dezembro de 2002.

Ministério da Saúde: **Resolução Da Diretoria Colegiada 153**, ANVISA. DOU, 15 de junho de 2004.

Ministério da Saúde. Nota Técnica – CGLAB/CGDT/DEVEP/SVS. Nº03/06. **Resultado da avaliação dos “Kits” para diagnóstico de Doença de chagas.** Maio, 2006.

Moncayo A, Luquetti AO. **Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.1990;85(4):489-495.

Nakane PK. Kawoi A. **Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation.** Journal Histochemistry Cytochemistry. 1974; 22(12):1084-1091.

Oelemann WMR, Teixeira MGM, Costa GCV, Pereira JB, Castro JAF, Coura JR. **Evaluation of Three Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Diagnosis of Chagas' Disease.** Journal of Clinical Microbiology.1998; 36(9); p: 2423-2427.

Pan AA & Prat DM. **Amastigote and epimastigote stage-specific components of *T.cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of a 83-kilodalton amastigote protein.**1989.Journal of Immunology; 143: 1001-1008.

Pessoa SM, Martins AV. **Parasitologia Médica.** 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988;870p.

Peterson GL. **Determination of total protein.** In: Methods in Enzymology. Enzyme Structure. 1983; Part I.;91(12): 95-105.

Picka MCM, Domingos AM, Carvalho TB, Peresi E, Machado-Marcondes J. **Definition of a diagnostic routine in individual with inconclusive serology for Chagas' disease.**The Brazilian Journal of infectious disease.2007;11(2):226-233.

Piron M, Fisa R, Casamitjana N, Chejade PL, Puig L, Vergés M et al. **Development of a real- time PCR assay for *T. cruzi* detection in blood samples.**Acta.Tropica.2007;103:195-200.

Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda. **Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase.** Revista Saúde Pública. 2003; 37(1):107-115.

Prata A. **Clinical and epidemiological aspect of Chagas' disease.** Lancet infectious disease.2001; 1(2):92-100.

Russomando G, Figueiredo A, Almiron M, Sakamoto M, Morita K. **Polymerase chain reaction-based detection of T. cruzi DNA in serum.** J.Clin.Microbiol.1992; 30:2864-2868.

Salles NA, Sabino EC, Cliquet MG, Eluf NJ, Mayer A, Almeida-Neto C et al. **Risk of exposure to Chagas' disease among seroactive Brazilian blood donors.** Transfusion.1996; 36: 967-73.

Sanchez MCA. **Testes Sorológicos.** In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001: 24-41.

Schägger H. Jagow VG. **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa.** Analytical Biochem .1987; 166: 368-379.

Scherf A, Mattei D, Schreiber M. **Parasite antigens expressed in Escherichia coli. A refined approach for epidemiological analysis.** Journal of Immunolog. Methods.1990; 128:81-87.

Scott MT & Snary D. **American Trypanosomiasis (Chagas' disease).** In : Cohen S & Warren K. Immunology of parasitic infections.1982; 2ed. Oxford : Blackwell Scientific publications.p. 261-298.

Schmunis GA, Cruz JR. **Safety of the blood supply in latin america.** 2005. Clin.Microbiol; 18(1):12-29.

Schmunis GA, Zicker F, Pinheiro F, Bennett-Branding D. **Risk for transfusion-transmitted infectious disease in Central and South America.** Em. *Infect. Diseases.* 1998. 4(1): 5-11.

Schmunis GA. **Epidemiology of Chagas' disease in non-endemic countries: the role of international migration.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2007; 102(I): 75-85.

Silva ED. **Padronização da produção do teste para diagnóstico Imunológico da doença de Chagas utilizando as proteínas recombinantes CRA& FRA.** Rio de Janeiro; 2003; Mestrado em Biologia Molecular – Instituto Oswaldo Cruz.60p.

Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. **Chagas' disease recombinant T. cruzi antigens for serological diagnosis.** *Trends in parasitol.*2001; 17(6):286-291.

Soares MBP, Carvalho LP, Santos RR. **The pathogenesis of chagas'disease when autoimmune and parasite specific immune response meet.** *An. Acad. Bras.Ciênc.*2001; 73(4):547-559.

Souza MH. **Sorologia indeterminada para doença de Chagas na triagem de doadores de sangue: o que fazer?** *Revista Soc.Bras. Med. Trop.* 2006;39 (III): 54-55.

Souza MH, Martin PRJ, Pereira GA, Silva MMF, Abud MB. **Perfil sorológico para doença de Chagas dos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberaba.** *Rev. Bras. De Hematologia e Hemoterapia.* 2006; 28(2): 105-109.

Stothard JR, Frame IA, Miles MA. **Genetic diversity and genetic exchange in T. cruzi: Dual drug-resistant "progeny" from episomal transformants.** *Mem.Inst. Oswaldo Cruz.* 1999. 94(1):189-193.

Take GB, Snary D. **South American trypanosomiasis (Chagas`disease) In: Warren, K. Immunology and molecular biology of parasitic infections.** 1992. 3 ed. Boston Backwell Scientific publications, 1992. Cap.11:213-236.

Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturn NR. **Evolution and pathology in Chagas' disease**. Mem.Inst.Oswaldo Cruz.2006(a); 101(5):463-491.

Teixeira ARL, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. **Chagas' Disease**. Postgrad. Med.Journal. 2006(b);82:788-798.

Umezawa ES, Nascimento MS, Kersper JRN, Coura JR, Pereira JB, Junqueira ACV et al. **Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of T. cruzi in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chagas' disease**. 1996. Journal of clinical microbiology; 34: 2143-2147.

Umezawa ES, Silveira JF. **Serological diagnosis of Chagas' disease with purified and defined T. cruzi antigens**. Mem.Inst. Oswaldo Cruz.1999; 94(1): 285-288.

Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Aldao RR et al. **An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of T. cruzi recombinant antigens**. Transfusion. 2003; 43:91-97.

Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henríquez D et al. **Serodiagnosis of Chronic and acute Chagas' disease with Trypanosoma cruzi recombinant proteins: Results of a collaborative study in six latin American countries**. J. Clin. Microbiol.2004; 42 (1): 449-452.

Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y et al. **Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital Trypanosoma cruzi**. Am.J.Trop.Med.Hyg. 2003; 68: 574-582.

Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett A. **Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease**. Lancet .1975;1: 426-428.

Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. **Use of simplified polymerase chain reaction procedure to detect T. cruzi in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area**. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1994;51:771-777.

WHO. **Chagas' disease**: Strategic direction for research. (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>), 2002 [capturado em 11/08/2005].



## 8 - ANEXOS

### 8.1 - Meios e Soluções

<b>A) Meio LB (meio Luria Bertani)</b>	<b>g/L</b>
Bacto-Triptona	10,0
Cloreto de Sódio (Merck)	10,0
Extrato de levedura	5,0
Água q.s.p	1

<b>B) Tampão de Lise Celular</b>	<b>[Concentração]</b>
Tris – Hcl pH 8,0 (Merck)	50 mM
PMSF (Sigma)	1 mM
Lisozima (Sigma)	5 mM
EDTA (Merck)	2,5 mM
Água q.s.p	1

<b>C) Tampão de sensibilização POP nº2061</b>	<b>g/L</b>
Carbonato de sódio anidro (Merck)	1,70
Bicarbonato de sódio anidro (Merck)	2,86
Água q.s.p	1 L
Estocagem 4°C	

<b>D) Tampão de Lavagem [20x] POP nº2064</b>	<b>g/L</b>
Cloreto de Sódio (Merck)	175,38
Fosfato de Sódio Dibásico (Merck)	20,44
Fosfato de Sódio Monobásico (Merck)	7,72
Tween 20 (Sigma)	0,01 L
Água q.s.p	1L

<b>E) Diluente do Conjugado POP nº2053</b>	<b>g/L</b>
Albumina bovina (Cultlab)	1
Tampão de Lavagem [20x]	0,05 L
Soro bovino (Cultlab)	0,1 L
Água q.s.p	1 L

<b>F) Diluente do Substrato POP nº2052</b>	<b>g/L</b>
Ácido Cítrico (Merck)	4,67
Fosfato de Sódio Dibásico (Merck)	7,30
Água q.s.p	1L

<b>G) Ácido Sulfúrico 2 M POP nº2055</b>	<b>g/L</b>
Ácido Sulfúrico(Merck)	0,111 L
Água q.s.p	1L

<b>H) Solução de Substrato POP nº2051</b>	<b>g/L</b>
Água Oxigenada (Merck)	0,1 L
Água q.s.p	1L

<b>I) Solução de Cromôgeno POP nº2054</b>	<b>g/L</b>
Tetrametilbenzidine (Sigma)	0,01 L
Dimetilsulfoxido (Merck)	1L

## 8.2 – Proposta de manual de instrução



### EIE-RECOMBINANTE-CHAGAS-BIO-MANGUINHOS (MATERIAL FORNECIDO PARA 96 REAÇÕES)



### ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

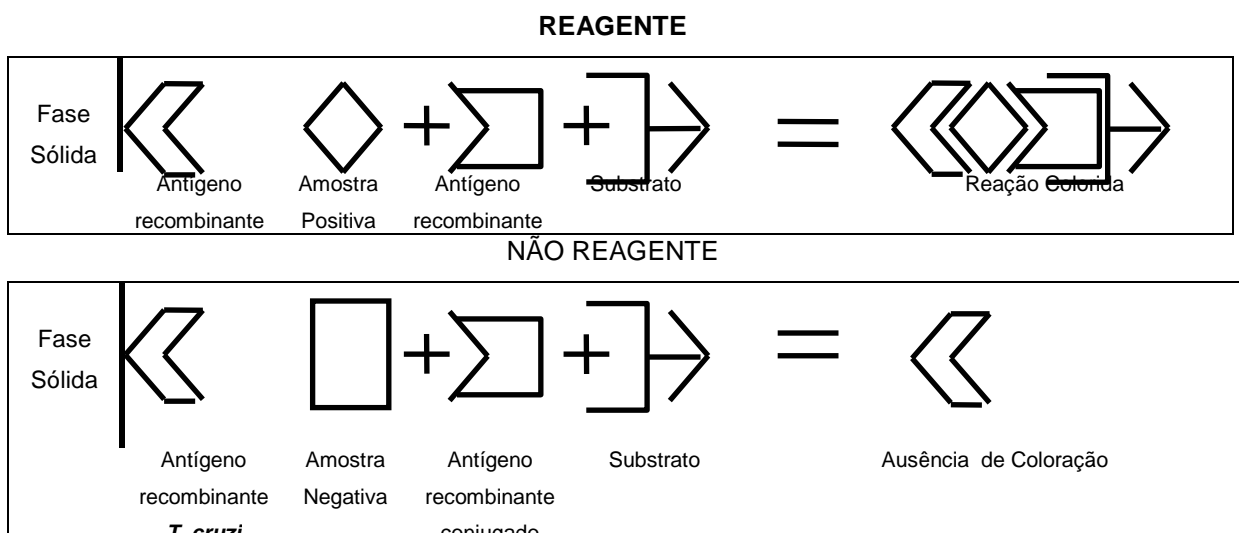
### SOMENTE PARA USO EM PESQUISA

#### PRINCÍPIO DO ENSAIO:

Este ensaio consiste na reação de soros ou plasmas humano com antígenos recombinantes de *T. cruzi*, obtidos a partir de cultura "in vitro", que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/tiras plásticas (Fase sólida). A seguir adicionam-se os soros controle do teste e as amostras a serem analisadas que, possuindo anticorpos específicos, vão se fixar aos antígenos. Na etapa seguinte, ao se adicionar um conjugado marcado com a enzima peroxidase, esta se ligará aos anticorpos caso estejam presentes nas amostras em teste.

Para evidenciação da reação, utiliza-se uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB) que pela ação da peroxidase sobre o peróxido de hidrogênio forma um composto de coloração azul turquesa. Ao adicionar-se o ácido sulfúrico para que interromper a reação, passa a apresentar uma coloração amarela, em caso positivo (reagente). Nas cavidades em que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente).

#### ESQUEMA DO TESTE:



**MATERIAL FORNECIDO:**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Tampão de Lavagem [20X]	30 mL
Diluyente do Conjugado	15 mL
Diluyente do Substrato	22 mL
Cromógeno (TMB)	0,3 mL
Substrato (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0,1 mL
Ácido Sulfúrico 2M	7 mL
Calibrador Positivo	0,35 mL
Calibrador Negativo	0,70 mL
Conjugado	0,15 mL
Tiras plásticas sensibilizadas	01 moldura com 6 Tiras plásticas duplas
Folhas Adesivas	01
Manual de instruções	01

**MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:**

- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc)
- Água destilada
- Micropipetas mono e multicanais e Ponteiras
- Barquetes ou reservatórios
- Estufa a 37°C
- Luva descartável
- Hipoclorito de Sódio ou água sanitária
- Espectrofotômetro, com filtro de 450nm, para microplacas
- Lavador automático ou sistema de vácuo com pente de lavagem e/ou pipeta pasteur

**CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL FORNECIDO:****MANTER ENTRE 2-8 °C:**

Diluyente do Conjugado  
 Tampão de Lavagem [20X]  
 Diluyente do Substrato  
 Cromógeno (TMB)  
 Substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
 Solução de Ácido Sulfúrico 2M  
 Tiras plásticas sensibilizadas  
 Calibrador Positivo  
 Calibrador Negativo

## Conjugado

Todos os componentes do teste, devem ser guardados nas temperaturas indicadas desde o ato do recebimento do conjunto, permanecendo estáveis pela validade definida na caixa principal do conjunto.

A temperatura do transporte com bobinas de gelo reciclável permite que o conjunto se mantenha em condições adequadas.

### **CUIDADOS E PRECAUÇÕES:**

- Todo material biológico pode representar uma fonte de infecção e risco químico. Portanto, ao manusear qualquer dos reagentes deste conjunto, observe as precauções necessárias. Além disso, a qualidade dos resultados obtidos depende do cumprimento das boas normas de segurança.
- As amostras de soro ou plasma assim como os controles podem conter agentes infecciosos e devem ser manipulados com cuidado.
- A solução de TMB (cromógeno) é irritante para pele e mucosas. Além disso, não devem entrar em contato com metais.
- Usar luvas descartáveis e jaleco durante todas as etapas do teste.
- Desprezar ponteiros, luvas, vidrarias, frascos, Tiras plásticas etc, em solução de hipoclorito de sódio a 1/20 ou água sanitária 1/10.
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes.
- Todos os frascos utilizados para diluir os componentes e preparar o substrato devem ter sido muito bem lavados e rinsados abundantemente com água destilada.
- As Tiras plásticas só podem ser utilizadas uma única vez, e recomenda-se evitar tocar a parte superior.

### **PROCEDIMENTO DO ENSAIO:**

OBS 1: Os controles positivos, negativos e as amostras bem como os demais reagentes, deverão estar a temperatura ambiente para sua utilização.

OBS 2: No momento de adicionar as amostras nos poços da(s) tiras plásticas(s) é indispensável homogeneizar bem a amostra.

1 - Distribuir 50 µL dos soros controle da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A" o soro controle positivo, nas colunas "B" e "C" o controle negativo, na coluna "D" somente o diluente do conjugado (sem soro), que servirá como controle do conjugado. Nos demais orifícios, distribuir 50 µL das amostras teste nos respectivos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
B	CN	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
C	CN	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
D	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
E	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89
F	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82	Amostra 90
G	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83	Amostra 91
H	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84	Amostra 92

CP = Controle Positivo CN = Controle Negativo SS = Sem soro

2 - Selar as tiras plásticas com a folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos.

3 - Preparo do tampão de lavagem:

**Obs:** este tampão é sujeito a cristalização e neste caso, colocar em banho-maria a 37°C até a dissolução dos cristais:

Nº Tiras plásticas	Nº de reações	T. Lavagem (20 X) (R-02)	H <sub>2</sub> O Destilada
1	Até 16	4,0 mL	76,0 mL
2	Até 32	8,0 mL	152,0 mL
3	Até 48	12,0 mL	228,0 mL
4	Até 64	16,0 mL	304,0 mL
5	Até 80	20,0 mL	380,0 mL
6	Até 96	24,0 mL	456,0 mL

4 - Descolar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µL/orifício). Aguarde 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

5 - Diluir o conjugado no respectivo diluente do conjugado.

6 - Preparo do conjugado:

Nº Tiras plásticas duplas	Nº de reações	Diluente conjugado (R-01)	Conjugado (R-09)
01	Até 16	2 mL	20 µL
02	Até 32	2,5 mL	25 µL
03	Até 48	3 mL	30 µL
04	Até 64	4 mL	40 µL
05	Até 80	5 mL	50 µL
06	Até 96	6 mL	60 µL

7 - Homogeneizar bem e distribuir 50µL da diluição do conjugado em cada orifício dos Tiras plásticas.

8 - Selar e incubar as tiras plásticas conforme descrito no item 2 e, em seguida, aspirar e lavar conforme descrito no item 4.

9 - Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro.

a) Preparo do substrato:

Nº Tiras plásticas	Nº de reações	T. Substrato (R-03)	Cromógeno (TMB) (R-04)	Substrato (H2O2) (R-05)
01	Até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
02	Até 32	4,0 mL	40 µL	8 µL
03	Até 48	6,0 mL	60 µL	12 µL
04	Até 64	8,0 mL	80 µL	16 µL
05	Até 80	10,0 mL	100 µL	20 µL
06	Até 96	12,0 mL	120 µL	24 µL

10 - Distribuir 100 µL do substrato rapidamente em todos os orifícios.

11 - Incubar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos.

12 - Bloquear a reação adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios.

### **LEITURA**

- Ligar o Espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm e após alguns minutos para estabilização do feixe de luz, iniciar a leitura.

- Cálculo do Cut-Off:  $CO = \bar{X} CN + 0,150$

CO = Cut-Off

$\bar{X} CN$  = Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo

0,150 = Fator de Correção

## RESULTADOS

**AMOSTRAS REAGENTES** = As que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao Cut-Off.

**AMOSTRAS NÃO REAGENTES** = As que apresentarem densidade ótica inferior ao Cut-Off.

**OBS.:** Recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o Cut-Off e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

co		
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS

### VALIDAÇÃO DO TESTE:

Considerar o teste válido quando os valores da densidade ótica estiverem na faixa descrita abaixo:

- Controle Positivo:  $\geq 0,500$  densidade ótica
- Controle Negativo:  $\geq 0,050 \leq 0,120$  densidade ótica

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Almeida E, Krieger MA, Carvalho MR, Olemam W, Goldemberg S. **Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease and blood bank screening.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.1990; 85(4):513-517.

ANVISA. **Relatório de produção da hemorrede em 2002: perfil sorológico dos doadores.**Disponível em: <[HTTP://www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) - acesso em 10 março 2004.

Barrett MP, Burchmore RJS, Stich A, Lazzarijo JO, Frasch AC, Cazzulo JJ. **The trypanosomiasis.** The lancet. 2003; 362: 1469-1480

Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Assuda SY, Ferreira AW. et al. **Chagas' disease diagnosis: Evaluation of different tests in blood bank screening.** Transfusion.1993; 33(10):830-834.



Gadelha AA, Vercosa AF, Lorena VM, Nakazawa M, Carvalho AB, Souza WV et al. **Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test.** *Vox Sang.* 2003 Oct; 85(3):165-70.

Gomes YM, Pereira VR, Nakazawa M, Rosa DS, Barros MNDS, Ferreira AGP et al. **Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001 May; 96(4): 497-501.

Kolosova AY, Shim WB, Yang ZY, Eremin SA, Chung DH. **Direct competitive ELISA base don monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples.** *Anal Bioanal.Chem.*2006; 384: 286-294.

Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Laffaille JJ, Pereira JB, Krieger H et al. **Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease.** *Am J Trop Med Hyg.* 1992;46: 427-434.

Krieger MA, Salles JM, Almeida E, Linss J, Bonaldo MC, Goldemberg S. **Expression and polymorphism of a Trypanosoma cruzi gene encoding a cytoplasmatic repetitive antigen.** *Experimental Parasitology.* 1990; 70(3): 247-254.

Lafaille JJ, Linss J, Krieger MA, Padron TS, Souza W, Goldemberg S. **Structure and expression of two Trypanosoma cruzi genes encoding antigenic proteins with repetitive epitopes.** *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1989;35: 127-136.

Medronho RA, Perez MA. **Testes diagnósticos.** In: Medronho RA, Carvalho DM, Luiz RR, Werneck GL.. *Epidemiologia.* 2ed. São Paulo: Atheneu, 2002; p.259-270

Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Doença de Chagas. **Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública.** Série TELELAB. Brasília. 1998; 71p.

Ministério da Saúde. Nota Técnica – CGLAB/CGDT/DEVEP/SVS. N°03/06. **Resultado da avaliação dos “Kits” para diagnóstico de Doença de chagas.** Maio, 2006(a).

Ministério da saúde: **Resolução Da Diretoria Colegiada Nº206 ANVISA. DOU**, 17 de Novembro de 2006 (b).

Moncayo A, Luquetti AO. **Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.1990;85(4):489-495.

Nakane PK. Kawoi A. **Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation**. Journal Histochemistry Cytochemistry. 1974; 22(12):1084-1091.

Sanchez MCA. **Testes Sorológicos**. In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001: 24-41.

Scherf A, Mattei D, Schreiber M. **Parasite antigens expressed in *Escherichia coli*. A refined approach for epidemiological analysis**. Journal of Immunolog. Methods.1990; 128:81-87.

Silva ED. **Padronização da produção do teste para diagnóstico Imunológico da doença de Chagas utilizando as proteínas recombinantes CRA& FRA**. Rio de Janeiro; 2003; Mestrado em Biologia Molecular – Instituto Oswaldo Cruz.60p.

Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett A. **Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease**. Lancet .1975;1: 426-428.

WHO. **Chagas' disease: Strategic direction for research**. (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>), 2002 [capturado em 11/08/2005].

#### **ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:**

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto, poderão ser obtidas junto a: Fundação Oswaldo Cruz / Bio-Manguinhos / Departamento de Reativos para Diagnóstico

Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – CEP: 21045-900 – Rio de Janeiro – RJ

CGC:33.781.055/0015-30

Tel: (21) 3882-7140 – FAX: (21) 2260-4727

SAC: 0800210310

[www.bio.fiocruz.br](http://www.bio.fiocruz.br)

**edição: Abril/2009**