

DOENÇA DE CHAGAS: DIAGNÓSTICO DE LABORATÓRIO

Antonio Walter Ferreira clawsmbf@usp.br

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – Universidade de São Paulo

O diagnóstico de laboratório da doença de Chagas é feito por métodos parasitológicos, radiológicos e por testes sorológicos.

Os métodos parasitológicos de diagnóstico podem ser utilizados tanto na fase aguda como na fase crônica da doença.

Na fase aguda são utilizados métodos diretos para pesquisa de tripanossomas na corrente sanguínea e, indiretos como o xenodiagnóstico que apresenta elevada sensibilidade. A pesquisa de tripanossomas pode ser feita por microscopia direta, onde o sangue é examinado entre lâmina e lamínula, durante as primeiras seis semanas da doença. Variáveis do método direto, como a coloração de Giemsa, gota espessa, concentração do sangue ou microhematócrito, aumentam a probabilidade da detecção de baixas parasitemias. Uma variável promissora, o sistema *Quantitative Buffy Coat* (QBCA- METHOD), que está sendo utilizado na pesquisa de plasmódios, tem sido aplicado com sucesso na pesquisa de tripanossomas, principalmente quando o nível de parasitemia é muito baixo. Vários autores referem à importância do método na pesquisa de tripanossomas em recém-nascidos com infecção congênita, em material de medula óssea, em pacientes cardíacos transplantados e em líquido cefalorraquidiano.

O método *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é altamente sensível para detecção de DNA do parasita. Para a doença de Chagas poderia representar importante procedimento para os casos com resultados sorológicos duvidosos. Em outras palavras, poderia ser utilizado como *Gold Standard Test* na definição da etiologia chagásica. Vários pesquisadores têm estudado a padronização do método para ser aplicado na seleção de doadores de sangue, em inquéritos epidemiológicos ou para diagnóstico da infecção congênita. O tempo necessário para execução do teste, o alto custo e os falsos resultados positivos obtidos, decorrentes de contaminação ambiental, têm limitado a utilização do método.

Em relação à sensibilidade do PCR, Sturm et al. detectaram 0,1% do genoma de um único parasita, na presença de bilhões de DNA humano, quando utilizaram um fragmento de cinetoplasto de *T. cruzi*. Maior sensibilidade foi obtida por Moser et al., detectando 0,05% de DNA do parasita, utilizando uma sequência repetitiva nuclear de DNA. Experimentalmente em camundongos, o método tem permitido a detecção de 8 a 10 parasitas em 100ml de sangue.

Chiari, em 1999, comparou PCR com hemocultura e lise mediada por complemento na detecção da infecção por *T. cruzi* em indivíduos procedentes de diferentes regiões do Brasil, endêmicas ou não, e que apresentavam testes sorológicos positivos, negativos ou inconclusivos. A técnica foi capaz de detectar um parasita íntegro ou 0,01% de fragmentos de DNA de *T. cruzi* circulando no sangue de indivíduos contaminados. O desempenho da PCR foi avaliado em 126 amostras de sangue de indivíduos provenientes de áreas endêmicas (113) e não endêmicas (13). O método foi positivo em 83,5% dos indivíduos com sorologia positiva, 47,6% dos casos com sorologia negativa e 46,2% dos casos com sorologia inconclusiva. Dos dez indivíduos com PCR positivo e sorologia positiva, oito apresentavam lise mediada por complemento positiva. No grupo controle 100% das amostras foram PCR negativas. Os resultados sugerem que a PCR poderia ser utilizada como critério de cura pós-terapêutica antitripanossomicida e na seleção de doadores em bancos de sangue.

Os testes sorológicos são amplamente utilizados na doença de Chagas para selecionar doadores em bancos de sangue, para acompanhamento da terapêutica antiparasitária, para fins sociais na seleção de trabalhadores, para confirmar ou excluir uma suspeita clínica e para inquéritos soropidemiológicos. O resultado do teste sorológico é de probabilidade e sua positividade ou negatividade é influenciada por fatores inerentes aos testes ou ao hospedeiro, como a prevalência da doença, a sensibilidade e a especificidade dos testes e o estado imunológico do paciente.

Muitos testes têm sido padronizados e aplicados para os diferentes propósitos acima referidos.

É importante lembrarmos que *T. cruzi* apresenta grande complexidade antigênica, o que influencia a resposta imunológica do hospedeiro e tem levado diversos pesquisadores, através da biologia molecular e síntese de peptídeos,

a procurarem antígenos, altamente sensíveis e específicos, que sirvam para a pesquisa de anticorpos, quando fixados a suportes inertes ou para a pesquisa de antígenos circulantes, quando utilizados na produção de anticorpos monoclonais. Stolf, em 1992, definiu como antígeno ideal aquele que deveria estar presente em todas as cepas isoladas de diferentes áreas endêmicas, não estar presente em outros agentes etiológicos de doenças infecciosas e parasitárias, ser altamente imunogênico, estável e facilmente obtido para utilização em testes sorológicos.

A seguir, vamos abordar os testes que estão sendo utilizados atualmente na sorologia da doença de Chagas em diferentes países do mundo.

Hemaglutinação

Teste amplamente utilizado para fins de diagnóstico, triagem e inquéritos soroepidemiológicos. Hemácias de mamíferos ou de aves previamente tratadas por aldeídos, como o formol, são sensibilizadas com componentes antigênicos de *T.cruzi*, parcialmente ou totalmente solubilizados. O produto liofilizado ou em suspensão apresenta excelente estabilidade, por longo período de tempo mesmo em condições adversas de armazenagem e temperatura. O teste quantitativo ou qualitativo é feito em placas plásticas, normalmente utilizadas para microtitulação. Hemácias frescas, não tratadas com aldeídos, quando sensibilizadas, apresentam boa sensibilidade na detecção de anticorpos anti *T.cruzi*, porém, apresentam baixa estabilidade, mesmo quando conservadas em baixas temperaturas.

Diferentes extratos antigênicos de *T.cruzi* têm sido utilizados para sensibilizar as hemácias. O extrato antigênico alcalino, obtido por digestão dos parasitas com hidróxido de sódio, e o extrato obtido por sonicação de parasitas com solução tamponada de fosfatos são os que apresentam melhor desempenho na sorologia da doença de Chagas. O tratamento prévio dos soros com 2 mercaptoetanol aumentou a especificidade do teste.

O teste de hemaglutinação foi testado por Neal e Miles, utilizando a cepa Y cultivada em meio de LIT, em eluatos de sangue coletado em papel de filtro, de populações de diferentes países da América Latina. Não foram observadas diferenças regionais na resposta de anticorpos, dando a entender que a somatória de epítomos antigênicos presentes no parasita compensa eventuais variações antigênicas regionais.

O teste de hemaglutinação é recomendado para triagem de doadores de sangue, em pequenos bancos de sangue, por ser prático, de fácil manipulação e de baixo custo. O limiar de reatividade do teste deve ser determinado para cada serviço, principalmente em laboratórios de bancos de sangue que necessitam de testes com máxima sensibilidade. Atualmente, existem no mercado brasileiro “kits” bem padronizados de diferentes procedências, que atendem às exigências estipuladas pelas normas técnicas do Ministério da Saúde, conforme dados publicados após reunião patrocinada pelo Ministério.

Imunofluorescência

O teste de imunofluorescência indireto normalmente é feito com formas epimastigotas de *T.cruzi*, cepa Y, obtidas a partir de cultura em meio de LIT. Tripanosomas formolizados são fixados em lâminas de vidro e incubados com o soro diluído, por 30 minutos, a 37°C. Após lavagens, as lâminas são incubadas com conjugado fluorescente (soro de carneiro ou cabra anti IgG ou anti IgM humanas marcado com isotiocianato de fluoresceína). Após incubação e lavagens, o preparado é analisado por microscopia de fluorescência. O teste de imunofluorescência para pesquisa de anticorpos IgG anti *T.cruzi* tem sido considerado como teste de referência na sorologia da doença de Chagas. A pesquisa de anticorpos IgM anti *T.cruzi* tem valor significativo no diagnóstico da doença aguda.

Diferenças antigênicas são observadas nos diferentes estágios evolutivos de *T.cruzi*. Camargo encontrou títulos de anticorpos mais elevados com formas tripomastigotas do que com formas epimastigotas. Primavera et al. compararam formas epimastigotas com formas amastigotas e tripomastigotas de *T.cruzi*. Concluíram que as formas amastigotas são mais reativas para detecção de anticorpos IgA anti *T. cruzi*, principalmente em pacientes com a forma digestiva da doença. Esse achado foi importante para corroborar as observações feitas por Luquetti et al. que encontraram casos de pacientes chagásicos, confirmados pelo xenodiagnóstico, com falsos resultados negativos na pesquisa de anticorpos IgG anti *T.cruzi*, utilizando formas epimastigotas fixadas em lâminas de microscopia. Por

serem muito reativas, as formas amastigotas podem apresentar falsos resultados positivos, e atenção especial deve ser dada ao limiar de reatividade do teste.

Diferentes fatores podem influenciar o resultado do teste de imunofluorescência. A qualidade da microscopia de fluorescência e dos antígenos, a diluição correta do conjugado e o critério de leitura dos preparados obtidos são os principais fatores envolvidos no teste e devem ser rigorosamente padronizados para obtenção de resultados confiáveis. Para se considerar uma reação positiva é necessário que toda a parede celular do parasita esteja fluorescente. Fluorescência pontilhada ao longo da parede pode significar que os parasitas estejam em processo de deterioração por umidade residual. Fluorescência de corpo indica uma reação inespecífica principalmente relacionada à presença de outras patologias.

Em relação ao limiar de reatividade do teste, na triagem sorológica em bancos de sangue, tem sido recomendado 1:20 e 1:40. Alguns serviços utilizam limiares mais baixos, o que contribui para o aparecimento de falsos resultados positivos. Cuidados adicionais como o acompanhamento clínico dos doadores soro positivos, sem antecedentes chagásicos, têm sido recomendados para definição do verdadeiro quadro clínico do doador e evitar a sua marginalização pela sociedade.

Em laboratórios clínicos normalmente o limiar de reatividade utilizado é 1:40, para a pesquisa de anticorpos IgG anti *T. cruzi*.

Enzimaimunoensaio

Ferreira, em 1975, descreveu a padronização e a utilização do teste de imunoperoxidase no diagnóstico da doença de Chagas, utilizando formas epimastigotas de *T. cruzi*, formolizadas e fixadas em lâminas de microscopia como antígeno e conjugado enzimático (soro de carneiro ou cabra conjugados a peroxidase). Após incubação com soro diluído e conjugado, o complexo é revelado com substrato e doador de hidrogênio. O teste padronizado apresentou a mesma sensibilidade e especificidade observadas para a imunofluorescência. O aspecto prático é que a coloração resultante pode ser visualizada por microscopia óptica comum, o que reduz consideravelmente o custo do teste.

Voller et al. descreveram o teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para o diagnóstico da doença de Chagas. O teste foi padronizado em placas de microtitulação, com componentes antigênicos solúveis de *T. cruzi* previamente adsorvidos. Após incubação com soro e conjugado enzimático, a reação é revelada com substrato e doador de hidrogênio que libera cor no sobrenadante. A intensidade da coloração, proporcional a quantidade de anticorpos presentes na amostra, é avaliada por espectrofotometria.

O teste imunoenzimático padronizado abriu amplas perspectivas na sorologia da doença de Chagas, por ser sensível, específico, com leitura objetiva e passível de automação. A possibilidade de utilizar frações antigênicas definidas, obtidas por processos físicos e químicos, síntese ou biologia molecular, é um objetivo que está sendo investigado por diferentes pesquisadores em diferentes partes do mundo. O exemplo do teste de hemaglutinação existe, no mercado, com reagentes bem padronizados para serem usados, principalmente na triagem de doadores de sangue. Oelemann et al., em 1998, fizeram um estudo para avaliar o desempenho de diferentes reagentes comerciais. Mostraram que dependendo da área onde as amostras de sangue foram coletadas, a especificidade dos reagentes variou de 93,3% a 100%, a sensibilidade de 97,7 a 100% e a precisão de 93,6 a 100%. Nenhum dos reagentes comerciais apresentou índice de 100% para os parâmetros avaliados.

Uma das aplicações do teste imunoenzimático é a possibilidade da utilização de antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos fixados à superfície de placas de microtitulação. Essa possibilidade poderá se tornar uma ferramenta importante no aprimoramento do diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Umezawa et al., em 1999, testaram seis antígenos recombinantes no teste imunoenzimático: H49, JL7, JL8, B13, A13 e 1F8, em 541 amostras de soros (304 de pacientes chagásicos e 237 amostras de indivíduos não chagásicos) provenientes de nove países: Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Colômbia, El Salvador, Venezuela, Guatemala e Honduras. A sensibilidade do ensaio variou de 93,4 a 99%, e a especificidade foi de 96%. Nesse estudo usando formas epimastigotas do parasita obteve sensibilidade de 100% e especificidade de 84%. Foi sugerido que a associação de diferentes antígenos recombinantes poderia fornecer índices máximos de sensibilidade e especificidade, fato que precisa ser muito bem estudado.

Western Blotting

Diferentes laboratórios do mundo estão pesquisando um método de laboratório que seja confirmatório da infecção chagásica. Dos diferentes métodos que estão sendo apresentados, o descrito por Umezawa et al., em 1996, parece ser o mais realista no diagnóstico da doença de Chagas. O método denominado TESABLOT é um *Western Blotting* feito a partir de antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Trabalhando com amostras de sangue de pacientes chagásicos, formas congênita, aguda e crônica, e de indivíduos não chagásicos os pesquisadores encontraram 100% de sensibilidade e especificidade. Mostrou que após a corrida eletroforética e transferência para fitas de nitrocelulose, os soros de pacientes crônicos e agudos reconhecem bandas diferentes. Na nossa experiência, o método foi capaz de resolver 80% dos casos considerados inconclusivos pela sorologia convencional.

Conduta referente a resultados inconclusivos de provas sorológicas para diagnóstico da doença de Chagas

A sorologia usada como ferramenta de diagnóstico fornece resultados que devem ser interpretados em associação com dados clínicos e epidemiológicos do paciente. Os resultados dependem da sensibilidade e especificidade do teste empregado e do estado imunológico do paciente. Muitas vezes, testes de elevada sensibilidade fornecem resultados clínicos de pouco valor que, inclusive podem interferir negativamente na conduta do clínico. Para evitar essas interferências e entendendo os resultados sorológicos como de probabilidade, costuma-se utilizar como conduta dois testes geralmente de princípios diferentes para um melhor conhecimento do estado imunológico do paciente frente a um determinado processo patológico. Se de um lado essa é a melhor alternativa, de outro temos que resolver problemas decorrentes de resultados discrepantes que levam a indefinição do diagnóstico sorológico.

Na doença de Chagas “resultados inconclusivos” são frequentes tanto no diagnóstico individual como na triagem de doadores em bancos de sangue. Na triagem de doadores de sangue durante muitos anos foi lei obrigatória no Brasil, para a doença de Chagas, a utilização de dois testes de princípios diferentes para a seleção de bolsas de sangue. Inicialmente os bancos de sangue utilizavam, na rotina, os testes de imunofluorescência indireta e hemaglutinação na triagem sorológica. Para o sorologista ficava claro que essa associação traria resultados discrepantes uma vez que a sensibilidade e a especificidade dos testes eram diferentes. Mais tarde, o teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), passível de ser automatizado, passou a ser utilizado como principal teste associado a imunofluorescência indireta e/ou a hemaglutinação. Da mesma forma, em qualquer uma das associações propostas, resultados inconclusivos eram obtidos. Para os bancos de sangue, a recusa das bolsas de sangue era obrigatória quando os resultados eram reagentes nos dois testes ou reagente em apenas um teste. O elevado índice de rejeição de bolsas, principalmente quando um dos testes escolhidos era o de imunofluorescência indireta, de leitura subjetiva e de difícil padronização, levou diferentes setores da hemoterapia a reclamarem por mudanças na lei do sangue. Em dezembro de 2003 foi aprovada pelo Ministério da Saúde em uma nova portaria que regulamentou a triagem sorológica do sangue. Para a doença de Chagas foi aprovada a utilização de “um teste sorológico de alta sensibilidade”. A definição do índice mínimo de sensibilidade ficou por conta dos editais publicados pelos bancos de sangue quando da concorrência para a compra do reagente.

Para os laboratórios clínicos a situação permaneceu inalterada, pois a maioria utiliza dois testes na sua rotina, seguindo determinação da Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) / Organização Mundial da Saúde (OMS).

Na tentativa de sanar os problemas decorrentes de resultados inconclusivos, pesquisadores de várias partes do mundo procuraram padronizar um teste que fornecesse resultado que expressasse sorologicamente o verdadeiro estado imunológico do indivíduo frente à exposição ao *T. cruzi*.

Vários testes foram apresentados como candidatos a “teste confirmatório” da infecção chagásica, como foi amplamente publicado na literatura. Entre os testes, chama atenção o teste padronizado no Instituto de Medicina

Tropical de São Paulo por Umezawa et al.. O teste denominado TESAblot é um imunoblot com antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidos no sobrenadante do cultivo celular do parasita. O teste apresentou sensibilidade de 100% em todas as avaliações feitas até o momento, utilizando painéis de soros de diferentes países da América Latina. A especificidade do teste é de 99%, mesmo quando avaliado frente a amostras de soros de pacientes infectados por *Leishmania sp.*

Os índices de sensibilidade e especificidade do TESAcruzi garante ao teste valores preditivos positivo e negativo que o comparam aos testes usados como confirmatórios para comprovação da infecção pelo HIV.

Referências

- Camargo ME. American trypanosomiasis (Chagas' Disease). In: Balows A, Hausler Jr. WJ, Ohashi M, Turano A. Springer-Verlag. Laboratory Diagnosis of infectious Diseases. Principles and Practice. New York. 1988; 744-53.
- Camargo ME, Hoshino S, Siqueira GRV. Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American Trypanosomiasis. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1973; 15: 81-85.
- 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.
- Chiari E. Diagnostic Tests for Chagas' disease. Parasitological diagnosis. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rasi A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil. 1992; p. 153-164.
- Chiari E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(1): 299-300.
- Ferreira AW. Diagnostic Tests for Chagas' disease. Serological diagnosis. Tests for Chagas disease serodiagnosis: a review. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rasi A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil. 1992; 179-194.
- Ferreira AW, Camargo ME, Nakahara OS. *Trypanosoma cruzi*: Immunoperoxidase antibody test for serologic diagnosis. Experimental Parasitology. 1975; 37: 131-137.
- Ferreira AW, Belem ZR, Moura MEG, Camargo ME. Aspectos da padronização de testes sorológicos para a Doença de Chagas: Um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de sangue. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1991; 33: 123-128.
- Ferreira AW, Camargo ME, Nakahara OS. Aplicação do teste ELISA ao diagnóstico sorológico da doença de Chagas. I. Estudo comparativo com o teste de imunofluorescência em amostras de sangue colhidas em papel de filtro. Abstracts Congresso Internacional de doença de Chagas, 1979. p.210.
- Hoshino-Shimizu S, Camargo ME, Nagasse TK. A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1978; 20: 208-212.
- Levy AMA. Padronização e avaliação do teste de imunofluorescência com tripomastigotas fixados *in situ* na detecção de anticorpos indicadores da persistência da infecção em chagásicos crônicos. [tese de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1991.
- Moser DR, Kirchoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by polymerase chain reaction gene amplification. J Clin Microbiol. 27:17744-1749.
- Neal RA, Miles RA. Indirect haemagglutination test for Chagas' disease, with a simple method for survey work. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1970; 12: 325-332.
- Oelemann WMR, Teixeira MGM, Peralta JM. Screening and confirmation in Chagas disease serology – A contribution. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(1): 307-308.
- Schmuñis GA. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94 (1): 93-101.
- Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, et al. Evaluation of recombinant antigens for Chagas disease serodiagnosis in South and Central America. J Clin Microbiol. 1999; 37: 1554-1560.

Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper Jr. N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira CV, et al.. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas disease. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2143-2147.

Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett A. A micro-plate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease. Lancet. 1975; 1: 426-429.