



LEVANTAMENTO DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA A DOENÇA DE CHAGAS

Bethânia Ribeiro de Almeida¹; Fabiano Costa Santiliano².

¹ Professora Mestre do Curso de Farmácia. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo – CCA-UFES, – Brasil.
bethaniaralmeida@yahoo.com.br

² Mestre em Biociências e Biotecnologia. CCA-UFES.
fabianosantiliano@yahoo.com.br

Recebido em: 04/05/2012 – Aprovado em: 15/06/2012 – Publicado em: 30/06/2012

RESUMO

Diversos métodos são utilizados para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas. Na fase aguda da doença, os tripomastigotas sanguíneos podem ser detectados por meio de métodos parasitológicos diretos, nos quais os parasitas são identificados diretamente no sangue do paciente. Nesta fase também podem ser empregados métodos parasitológicos indiretos como xenodiagnóstico e hemocultura, além de métodos moleculares como a PCR, que detectam o DNA do parasito. Os testes sorológicos são utilizados rotineiramente no diagnóstico da fase crônica e baseiam-se da detecção de imunoglobulinas específicas contra o *T. cruzi*, tais como os testes de fixação de complemento, hemaglutinação e imunofluorescência. Este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento das principais técnicas utilizadas na rotina diagnóstica da Doença de Chagas.

PALAVRAS-CHAVE: *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas, diagnóstico

ASSESSMENT OF THE DIAGNOSTIC METHODS FOR CHAGAS' DISEASE

ABSTRACT

Several methods are used for the laboratory diagnosis of Chagas disease. In the acute phase of illness, blood trypomastigotes can be detected by direct parasitological methods, in which parasites are identified directly in the patient's blood. This phase also can be used as indirect parasitological methods xenodiagnosis and blood culture, and molecular methods such as PCR, which detect the DNA of the parasite. Serological tests are used routinely in the diagnosis of chronic phase and are based on the detection of specific immunoglobulins against *T. cruzi*, such as tests complement fixation, hemagglutination and immunofluorescence. This study aimed to survey the main techniques used in routine diagnosis of Chagas disease.

KEYWORDS: *Trypanosoma cruzi*, Chagas Disease, diagnose

INTRODUÇÃO

A tripanosomíase americana ou Doença de Chagas foi descoberta pelo cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909, sendo descrito por este, a doença, o agente etiológico, os transmissores e reservatórios domésticos e silvestres, parte da patogenia e sintomatologia (CHAGAS, 1911).

A doença é causada pelo hemoprotozoário *Trypanosoma cruzi*, com estimativas de que cerca de 10 milhões de pessoas estejam infectadas ao redor do mundo, a maioria na América Latina onde a doença é endêmica. Mais de 25 milhões de pessoas vivem nas áreas de risco e estima-se que 10.000 morreram em consequência da doença em 2008 (WHO, 2008). Tem graves consequências sócio-econômicas, por se tratar de uma enfermidade crônica debilitante e incapacitante.

Trypanosoma cruzi

A espécie *Trypanosoma cruzi* faz parte do reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastidea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*. Apresenta grande diversidade biológica e bioquímica, que caracteriza as diferentes cepas existentes. Pode ser encontrada em diferentes hemípteros e animais silvestres e domésticos os mais variados.

Os insetos vetores são da classe Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Todas as espécies de triatomíneos são passíveis à infecção pelo *T. cruzi* por qualquer de seus estágios evolutivos, através da sucção de sangue de mamíferos infectados. A espécie *Triatoma infestans* é um dos principais vetores de *T. cruzi*, especialmente no Brasil, em parte, por ser esta espécie extremamente domiciliada, vivendo no microclima das habitações humanas.

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* envolve dois tipos de hospedeiros, um invertebrado e outro vertebrado, e três formas evolutivas bem características, que são: a) amastigota, forma replicativa no hospedeiro vertebrado encontrado no interior das células infectadas; b) tripomastigota, forma infectiva encontrada no sangue circulante de vertebrados e nas fezes do vetor invertebrado, onde recebem o nome de tripomastigotas metacíclicos; c) epimastigota, forma replicativa, encontrada nos intestinos médio e posterior do vetor triatomíneo contaminado (TOMLINSON et al., 1994), forma esta que não é infectiva para o hospedeiro vertebrado.

No hospedeiro vertebrado, o ciclo do *T. cruzi* inicia-se quando formas tripomastigotas metacíclicas, eliminadas nas fezes e urina do inseto vetor, são inoculadas na pele ou mucosas do vertebrado, através de lesões ou arranhaduras, onde serão potencialmente capazes de invadir qualquer tipo celular. Logo após a penetração na célula, a forma tripomastigota pode ser encontrada no interior de um vacúolo parasitóforo. Imediatamente, há a transformação para as formas amastigotas (BRENER, 1973), seguindo-se a ruptura do vacúolo e contato dos amastigotas com as estruturas citoplasmáticas celulares. Estas formas iniciam um processo de intensa multiplicação por divisão celular binária, após o qual, sofrem uma nova transformação para a forma tripomastigota. Através de movimentos intensos dos tripomastigotas a célula sofre lise, havendo liberação dos tripomastigotas no espaço intercelular, podendo cair na corrente sanguínea. Estes podem infectar outros tipos celulares, gerando um novo ciclo de amastigotas, ou serem sugados pelo inseto vetor dando início ao ciclo invertebrado.

O ciclo no invertebrado tem início quando o sangue de animais infectados contendo tripomastigotas é ingerido após o repasto sanguíneo. Estas formas sofrem diferenciação no intestino médio e posterior do inseto, onde assumem uma forma

arredondada, denominada esferomastigota, e a forma de epimastigotas. Estas se aderem na mucosa do órgão onde se multiplicam por sucessivas divisões binárias, após as quais migram para o reto. Neste local os epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos. Estas formas são liberadas nas fezes e urina do inseto (BRENER & ALVARENGA, 1976), penetrando no hospedeiro vertebrado, reiniciando assim o ciclo (Figura 1).

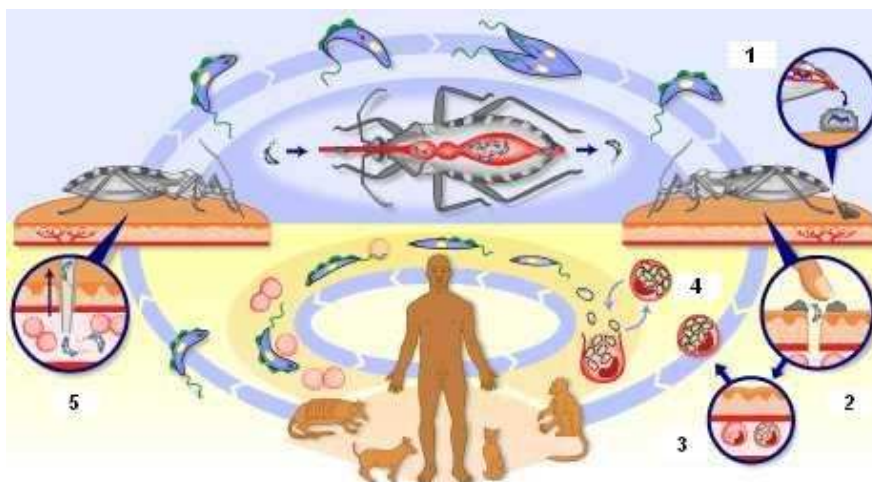


FIGURA 1. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. Formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas junto com as fezes e urina do inseto vetor (1), penetrando na pele do hospedeiro vertebrado através de arranhaduras (2), uma vez na corrente sanguínea estas formas infectam diversos tipos celulares, onde há diferenciação para as formas amastigotas (3). Estas diferenciam-se em tripomastigotas podendo infectar novas células (4) ou serem sugadas pelo vetor (5), diferenciando-se em seu intestino para epimastigotas, onde multiplicam-se e diferenciam-se na forma tripomastigota fechando o ciclo.

Fonte:(Modificado de <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas.htm>, 2002).

A infecção pode ser adquirida por distintas vias de transmissão, destacando-se: a) via vetorial, através do inseto vetor triatomíneo, que corresponde a 80-90% dos casos; b) transfusional, compreendendo de 5 a 20%, e c) congênita, com 0,5 a 8% de incidência(<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm>, 2002). Outras formas de transmissão como, por meio de acidentes laboratoriais e hospitalares, transplante de órgãos, transmissão oral, sexual e através de vetores não triatomíneos (DIAS & COURA, 1997; SOUZA et al., 2008), são excepcionais e não apresentam significativa importância em saúde pública.

A interação parasito-hospedeiro mostra-se bastante dinâmica na doença de Chagas, como resultado de múltiplos fatores ligados ao parasito (cepa e virulência), ao homem (idade e sexo) e ao ambiente.

A infecção apresenta duas fases bem características: a fase aguda, que tem duração de um a dois meses, apresentando alta parasitemia. Nesta fase, que corresponde à multiplicação do parasita, desenvolvem-se diversas reações inflamatórias no local da inoculação, como reações de hipersensibilidade tardia na mucosa dos olhos (Sinal de Romaña) e na pele (chagoma de inoculação), além de reações inflamatórias agudas características, como febre, esplenomegalia, entre

outras. A detecção é feita através de testes sorológicos diretos, como a avaliação de títulos de IgM anti-*T. cruzi* no soro. Após esta fase, a infecção é controlada gradualmente por mecanismos imunológicos envolvendo o sistema complemento e anticorpos específicos (BRENER, 1980). O decréscimo nos níveis de IgM e aumento nos de IgG caracterizam a transição para a fase crônica da doença (DIAS, 1984). A maioria dos casos agudos não tratados evolui para a chamada forma crônica indeterminada. Esta consiste na presença da infecção, revelada por sorologia e/ou métodos parasitológicos indiretos, associada à ausência de sintomatologia e aos exames clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos (coração, esôfago e cólon) normais, podendo permanecer por toda a vida, em 50% dos casos, de modo permanente, tendo muitas vezes sido chamada de forma laboratorial, subclínica ou assintomática.

O estágio crônico é marcado por uma queda na parasitemia e, a ausência de parasitas na corrente sanguínea é devido ao aumento no nível de anticorpos IgG, especialmente da classe IgG2 (BRODSKY et al., 1989). A remoção dos parasitas ocorre através de mecanismo fagocítico, dependente da porção Fc da imunoglobulina (UMEKITA et al., 1988), e de receptores de complemento dependente de fragmentos C3b ligados ao parasito (MOTA & UMEKITA, 1989). O diagnóstico é feito através de sorologia convencional, como imunofluorescência indireta, ELISA, hemaglutinação e fixação de complemento, sendo necessários métodos indiretos para a amplificação do parasita, como xenodiagnóstico, hemocultura e PCR (GOMES et al., 2009).

RESPOSTA IMUNE

A infecção pelo *T. cruzi*, semelhante ao que ocorre em outras infecções por micro-organismos patogênicos intracelulares, mobiliza diversos mecanismos efetores do sistema imune, havendo a ativação de fatores relacionados à imunidade inata e à imunidade adquirida. Conseqüentemente, o parasita passa a ser continuamente combatido, e tem sua multiplicação reduzida nos tecidos do hospedeiro. No entanto, a persistência indefinida do parasita, leva a uma atividade prolongada do sistema imune, culminando no aparecimento de lesões teciduais e, eventualmente a alterações funcionais musculares e nervosas, características da Doença de Chagas. As células e mecanismos efetores do sistema imune seriam então responsáveis, tanto pelo controle da multiplicação do parasita nos tecidos como pelas lesões locais resultantes da atividade antiparasitária.

O complexo ciclo de vida do *T. cruzi* envolve o surgimento de uma série de características que permitem a sua sobrevivência nos diversos microambientes no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado. As formas infectantes para o hospedeiro vertebrado desenvolveram diversos mecanismos que permitissem a sua sobrevivência no meio hostil, representado pelas células e pela corrente sanguínea do hospedeiro, como a expressão de moléculas em sua superfície com capacidade de interferir na ativação das vias clássica e alternativa do Sistema Complemento (ANSA-ADDO & INAL, 2010). Outros mecanismos de evasão utilizados são a renovação de moléculas de superfície através de vias endocíticas que auxiliam o parasito a livrar-se de anticorpos ligados à sua membrana (TEIXEIRA & SANTANA, 1989), e a liberação de imunocomplexos ligados à membrana mediada por clivagem de glicoproteínas ancoradas através de âncoras de glicosil fosfatidil inositol (GPI), mediada por fosfolipases (ALMEIDA et al., 1994).

DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Na fase aguda da doença de Chagas, os tripomastigotas sanguíneos podem ser detectados apenas através de métodos parasitológicos diretos, nos quais os parasitas são identificados diretamente no exame de sangue do paciente. Nesta fase também podem ser empregados métodos parasitológicos indiretos como xenodiagnóstico, hemocultura e PCR (AVILA et al., 1993; GOMES et al., 2009).

Os testes sorológicos são utilizados rotineiramente no diagnóstico da fase crônica e baseiam-se na detecção de imunoglobulinas específicas contra o *T. cruzi*, tais como os testes de fixação de complemento, hemaglutinação e imunofluorescência. Estes ensaios detectam os chamados anticorpos da sorologia convencional (ASC) dirigidos contra componentes citoplasmáticos ou de superfície de *T. cruzi*.

Anticorpos de reatividade distinta dos ASC foram identificados em camundongos experimentalmente infectados e denominados anticorpos líticos ou protetores (AL) (KRETTLI & BRENER 1982). Estes anticorpos apresentam as seguintes características: (a) são específicos contra tripomastigotas, reconhecendo e ligando-se apenas em tripomastigotas vivos; (b) induzem a lise mediada por complemento em tripomastigotas; (c) indicam a presença de infecção crônica ativa. O soro de pacientes chagásicos crônicos possui anticorpos líticos que reconhecem antígenos presentes somente na superfície de tripomastigotas vivos. Tais anticorpos podem ser detectados por citometria de fluxo (MARTINS-FILHO et al., 1995) ou por teste de lise mediada por complemento (KRETTLI & BRENER, 1982).

A seguir faz-se uma breve descrição dos principais métodos parasitológicos e imunológicos utilizados no diagnóstico da doença de Chagas.

MÉTODOS PARASITOLÓGICOS DIRETOS

Exame de sangue a fresco: é um processo amplamente utilizado durante a fase aguda, na qual uma gota de sangue (geralmente da polpa digital) é coletada e examinada em microscópio óptico com aumento de 400X. Todos os campos da lâmina devem ser analisados, afim de que se possa evidenciar a presença do parasita (GOMES, 1996).

Gota espessa: nesta técnica a visualização dos parasitas fica mais evidenciada em comparação ao exame de sangue a fresco. Duas ou três gotas de sangue são depositadas em 1 cm³ de uma lâmina, as hemácias são lisadas e a lâmina é corada pelo método de Giemsa. A observação é realizada com o auxílio da objetiva de imersão, procurando os parasitas por todos os campos da lâmina (LUQUETTI & RASSI, 2000).

Esfregaço: devido à baixa sensibilidade em comparação com os outros métodos parasitológicos, este método tem sido pouco utilizado na rotina laboratorial. É principalmente indicado para o estudo morfológico dos tripanossomas encontrados no exame de sangue fresco e/ou gota espessa para identificação da espécie. Giemsa e Leishman são os corantes utilizados nesta técnica (RASSI, 1992) (Figura 2).

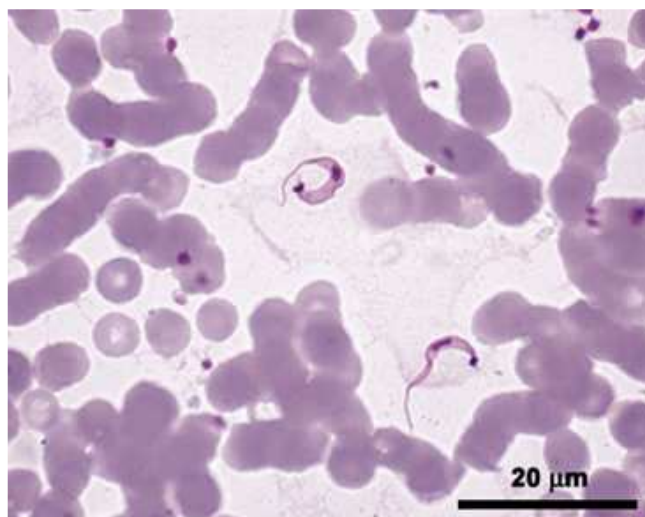


FIGURA 2. Formas tripomastigotas visualizadas em esfregaço sanguíneo.

Fonte: Ministério da Saúde, 2005.

Método de Strout: trata-se de uma técnica que visa a concentração de parasitas no sedimento e sua finalidade é aumentar a sensibilidade para evidenciar o *T. cruzi* em amostras de sangue. Amostras de 10 mL de sangue são coletadas por punção venosa, deixado em repouso para que ocorra retração do coágulo. Centrifuga-se a amostras por um período de três minutos a 160 x g. O sobrenadante é submetido a uma centrifugação de alta velocidade. Uma gota deste sedimento é analisada diretamente no microscópio. Se comparado com outros métodos de concentração, este apresenta sensibilidade superior, com cerca de 96,2% de positividade em casos agudos humanos. Uma modificação do método tem sido proposta pela Organização Mundial de Saúde, na qual o sangue é coletado em tubo capilar, centrifugado e a interface entre as hemácias e a camada de leucócitos é coletada e examinada ao microscópio óptico (LUQUETTI & RASSI, 2000).

MÉTODOS PARASITOLÓGICOS INDIRETOS

Na fase crônica da doença de Chagas o uso de métodos parasitológicos diretos é pouco confiável, devido principalmente à baixa parasitemia. Faz-se necessário, portanto a utilização de métodos indiretos, como o xenodiagnóstico e a hemocultura para que se estabeleça a ocorrência ou não dos parasitas.

Xenodiagnóstico: este método consiste em investigar a presença de parasitas nas fezes e/ou conteúdo intestinal dos insetos vetores, mantidos em laboratórios, e alimentados com sangue de indivíduos que serão testados. É bastante utilizado para se verificar a infecção chagásica não somente em humanos, mas também em animais. Quatro caixas contendo 10 triatomíneos cada, fechada em um de seus lados por uma fina rede são colocadas sobre a face ventral do antebraço do paciente por cerca de 30 minutos. Antes da realização deste exame é necessário que os triatomíneos sejam mantidos em jejum prévio por um período de duas semanas. Após a alimentação com sangue do paciente, os insetos devem ser mantidos a uma temperatura entre 25 e 30° C e umidade relativa de aproximadamente 85% na ausência de luz. O exame fecal ou do conteúdo intestinal será feito após 30-60 dias para pacientes em fase crônica e 10-30 dias para pacientes em fase aguda (BRITTO et al., 2001).

Hemocultura: existe uma grande variedade de meios de cultura nos quais o *T. cruzi* pode multiplicar-se abundantemente, tais como os meios difásicos com base de agar sangue (NNN) e outros. Meios líquidos como o LIT (“liver infusion tryotose”), BHI (“barin heart infusion”) e o meio Waren’s são também empregados. Esta técnica por vários anos não foi rotineiramente utilizada, pois se tratava de um método de baixa sensibilidade. Modificações na técnica tais como a coleta de maiores quantidades de sangue, enriquecimento do “creme” leucocitário, prolongamento do tempo de cultivo e realização de hemocultura seriada elevaram a sensibilidade para cerca de 94% (LUZ et al., 1994).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): este método consiste em amplificar através da reação em cadeia da polimerase, sequências de DNA específicas do parasita presente no sangue periférico e/ou tecidos de indivíduos ou animais infectados pelo *T. cruzi* (Figura 3). Após a coleta do sangue, o DNA total é extraído e amplificado utilizando-se iniciadores específicos previamente estabelecidos (SANCHEZ et al., 2005). Também a utilizada a técnica de PCR em tempo real que permite a quantificação das sequências de DNA do parasito amplificadas (DUFFY et al., 2009). A utilização da técnica da PCR tem se mostrado promissora na avaliação do nível de parasitemia dos pacientes em fase crônica submetidos ao tratamento com medicamentos (BRITTO et al., 2001; ZALUNTAY et al., 2004; DUFFY et al., 2009).

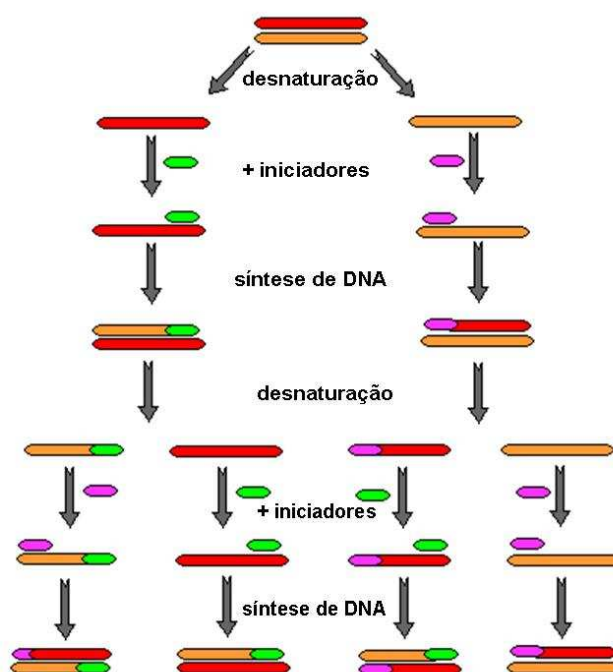


FIGURA 3. Esquema representativo da amplificação do DNA na PCR.

Fonte:

<<http://accn.net/Bio/book/BearFlag45/Biology1A/LectureNotes/lec24.html>>

Métodos Imunológicos

Os métodos imunológicos são de extrema importância para o diagnóstico clínico da doença de Chagas, especialmente na fase crônica da doença. Os testes imunológicos oferecem facilidade de execução e resultados em curtos prazos de tempo, diferentemente dos métodos parasitológicos mencionados. Estes testes baseiam-se principalmente na presença de IgG e IgM específicos, que começam a surgir na segunda ou terceira semana após a infecção e permanecem detectáveis durante toda a fase crônica.

Embora os testes imunológicos exibam alta sensibilidade, é comum a observação de problemas de especificidade devido às reações cruzadas com antígenos de outros parasitas, principalmente com os do gênero *Leishmania*. Por esta razão é critério da Organização Mundial de Saúde a obrigatoriedade de concordância em pelo menos dois de três testes imunológicos realizados nas mesmas amostras para definir a presença de anticorpos anti- *T. cruzi*. Outro questionamento com relação aos testes sorológicos é o fato destes detectarem somente a presença de anticorpos e não a presença do próprio parasita. Esta é uma importante consideração particularmente na escolha de testes de monitoramento de pacientes submetidos a tratamento quimioterápico.

Reação de Fixação de Complemento (RFC): este ensaio baseia-se na interação entre antígenos de *T. cruzi* e anticorpos do soro de pacientes chagásicos, seguida pela fixação do terceiro componente do sistema complemento (C3), levando à formação da C3 convertase (C3Bb). O soro a ser testado é inativado por temperatura, diluído em série e adicionado a uma placa de microtitulação previamente sensibilizada com antígenos de *T. cruzi*. Se houver anticorpos presentes no soro, ocorrerá a formação de imunocomplexos. A seguir é adicionada em cada poço uma fonte de Complemento geralmente proveniente de cobaia ou coelho. O passo seguinte é a adição em conjunto de hemácias de carneiro e anticorpos contra estas células (sistema indicador ou hemolítico). Se houver Complemento livre no meio, as hemácias serão lisadas, mas se o Complemento estiver ligado aos imunocomplexos não ocorrerá hemólise e a reação será considerada como positiva para *T. cruzi* (Figura 4). Trata-se de uma técnica bastante dispendiosa, envolvendo várias etapas, baixos índices de especificidade e sensibilidade em relação a outros testes sorológicos, não sendo mais utilizada de 1995 (GADELHA et al., 2003).

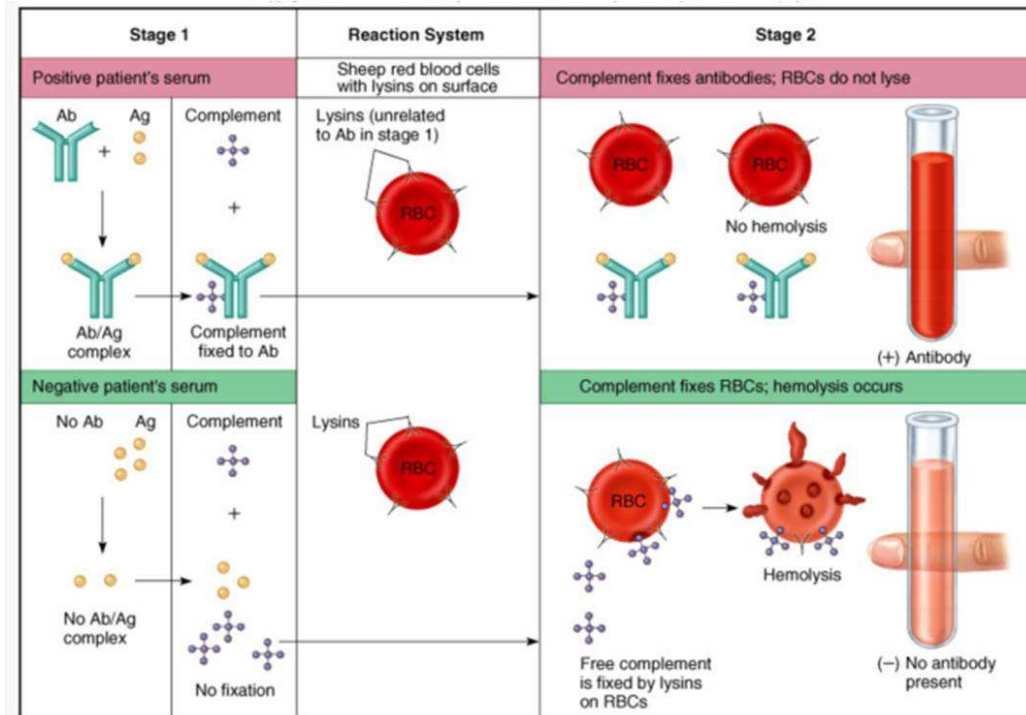


FIGURA 4. Representação esquemática da Reação de Fixação do Complemento.

Fonte:

http://www1.fccj.org/rpegg/mcb2010c/Cowan_HTML/chapter_17_ppt_rev1_files/frame.htm#slide0082.htm

Hemaglutinação: consiste numa reação muito simples, mais rápida e sensível que o teste de fixação de complemento, na detecção de anticorpos anti- *T. cruzi* no soro de indivíduos infectados. Baseia-se na aglutinação de hemácias de carneiro, recobertas com antígenos citoplasmáticos de *T. cruzi* em presença de soro que contenham anticorpos para este parasita (FUCHS et al., 1980). Havendo anticorpos anti-antígenos de *T. cruzi*, os mesmos formarão ligações entre as hemácias, interagindo com os antígenos na sua superfície. Assim visualmente ocorrerá a formação de um manto nas placas de microtitulação (Figura 5). Em virtude do baixo custo, nitidez dos resultados e simplicidade de execução tem sido amplamente utilizada em situações de rotina. Entretanto, apesar deste teste apresentar alta positividade, reações cruzadas com outras parasitoses, principalmente leishmaniose são observadas. Geralmente é mais comum se encontrar títulos altos (superiores a 128), nos meses iniciais da infecção, podendo permanecer nestes níveis por anos. Em casos de infecções muito recentes (30-45 dias), a hemaglutinação pode gerar resultados negativos (GADELHA et al., 2003).

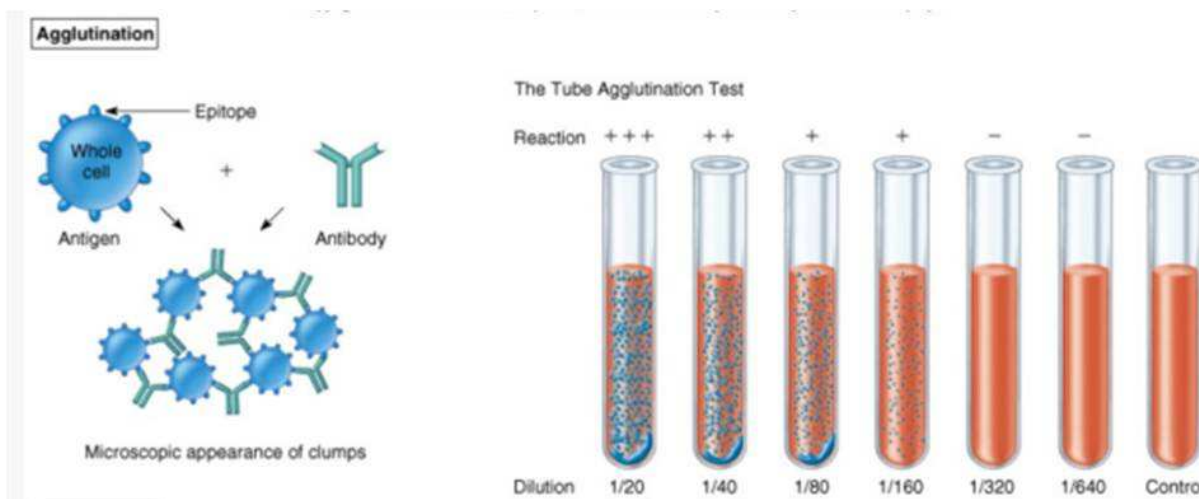


FIGURA 5. Representação esquemática do teste de Hemaglutinação.

Fonte: <http://www1.fccj.org/rpegg/mcb2010c/Cowan_HTML/chapter_17_ppt_rev1_files/frame.htm#slide0082.htm>

Imunofluorescência Indireta: há três décadas esta reação tem sido amplamente empregada no diagnóstico laboratorial da doença de Chagas. O antígeno é preparado com formas epimastigotas de *T. cruzi*, que são coletadas da cultura em meio LIT na fase exponencial de crescimento, lavados e fixados em solução de formol, paraformadeído e/ou liofilizado. Os anticorpos do soro de pacientes são colocados sobre uma lâmina contendo antígenos de *T. cruzi*. Os anticorpos anti- *T. cruzi* são revelados com o uso de anticorpos anti-imunoglobulina (Ig) humana conjugados a fluoresceína, e observados ao microscópio de fluorescência (Figura 6). O amplo uso deste método se deve principalmente às seguintes vantagens: relativa facilidade de se obter reações padronizadas, alta sensibilidade, regularidade dos resultados e a possibilidade de processamento simultâneo de um grande número de amostras. A principal desvantagem é que a leitura é subjetiva nos casos de baixos níveis de anticorpos (em casos de títulos muito baixos) havendo um pequeno percentual de reações cruzadas em torno de 0,1-1% (FERREIRA & ÁVILA, 2001).

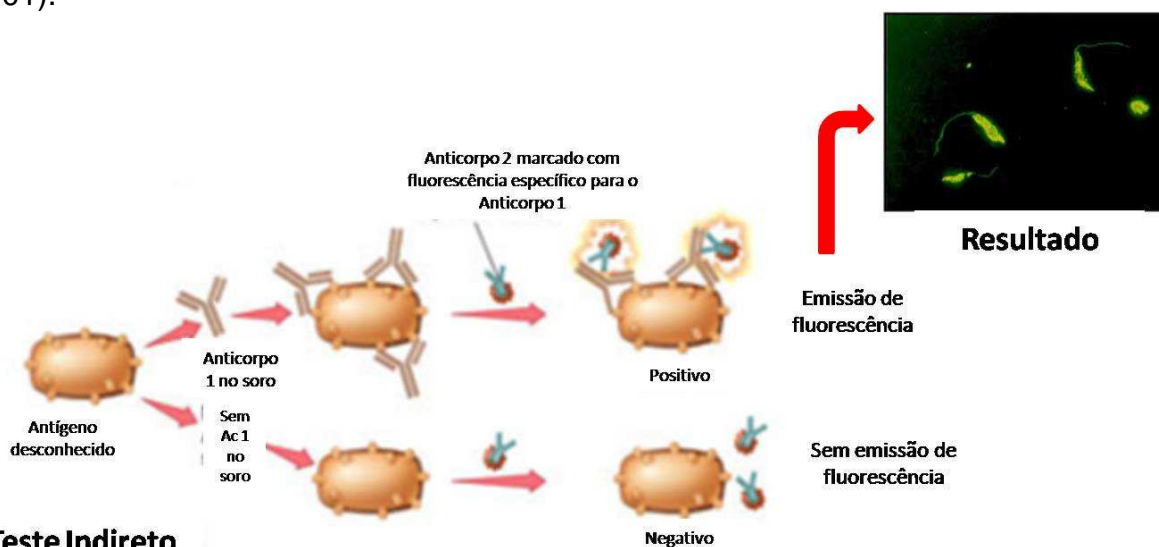


FIGURA 6. Representação esquemática do teste de Imunofluorescência Indireta.

Fonte: Adaptado de <http://www1.fccj.org/rpegg/mcb2010c/Cowan_HTML/chapter_17_ppt_rev1_files/frame.htm#slide0082.htm>

ELISA: esta técnica consiste em detectar anticorpos contra o parasita através da utilização de um segundo anticorpo (anti-imunoglobulina humana produzido em animais de laboratório) conjugados a enzimas, que em presença de substratos específicos geram produtos coloridos, cuja quantificação é feita espectrofotometricamente (VOLLER, 1975) (Figura 7). Este método oferece alta sensibilidade, utilização de baixas quantidades de soro, processamento simultâneo de várias amostras e finalmente fácil uso em trabalhos realizados em campo. Um dos principais problemas neste teste é a presença de reações falso-positivas, onde o valor da densidade óptica lida no espectrofotômetro fica muito próximo a linha de corte entre a amostra positiva e negativa (GADELHA et al., 2003).

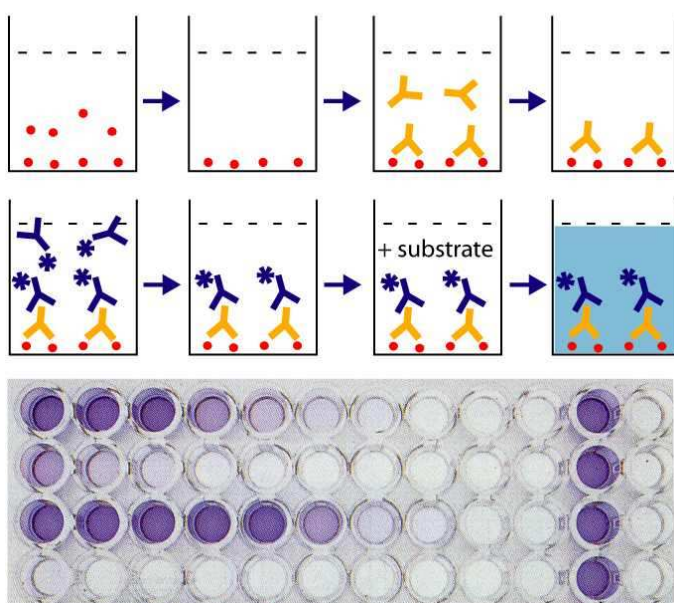


FIGURA 7. Representação esquemática do teste de ELISA. Fonte: <<http://www.kabeveren.net/projecten/20040320/Scientists.htm>>

Western Blot: nesta técnica o antígeno de *T. cruzi* é submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, para resolução das proteínas segundo o critério de massa molecular. Após transferência do material fracionado em gel para membranas de nitrocelulose (Figura 8), segue-se como no procedimento da reação antígeno-anticorpo semelhante ao método de ELISA. Os soros são colocados sobre as fitas de nitrocelulose e no caso de uma reação positiva haverá o aparecimento de bandas características (MORGADO et al., 1989).

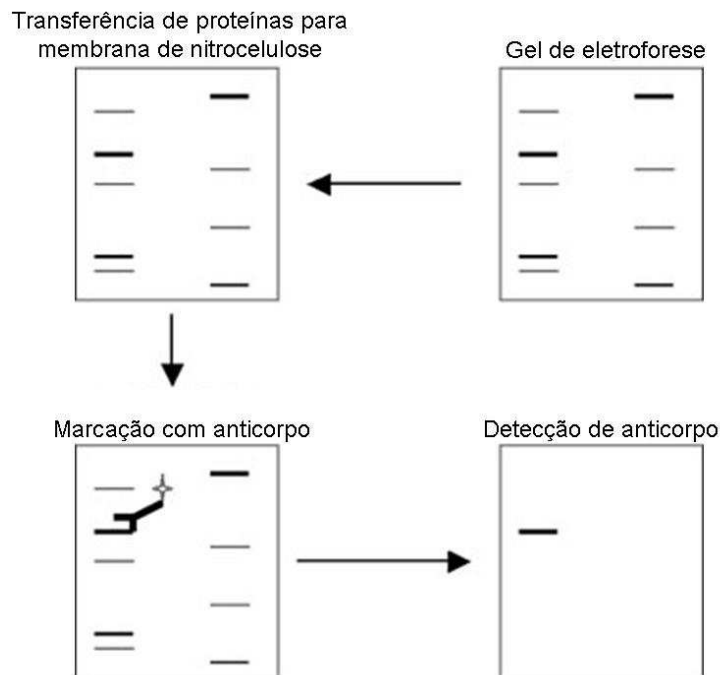


FIGURA 8. Esquema representativo do teste de Western blot.

Fonte:

<<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/Westernblot.html>>

Citometria de Fluxo: MARTINS-FILHO et al., (1995) propõe a utilização da técnica para a detecção de anticorpos específicos do soro de pacientes chagásicos ligados à antígenos de membrana de formas tripomastigotas vivas, a fim de que se pudesse avaliar a eficácia da quimioterapia nestes pacientes. O método se mostrou bem mais sensível e preciso em relação ao teste de lise mediada por complemento. Os resultados deste trabalho re-enfatizam a correlação entre a presença de anticorpos ligados à membrana do parasita e a presença de infecção ativa. Algumas variações mais modernas da técnica são amplamente utilizadas no diagnóstico da doença (MARTINS-FILHO et al., 2002).

É relevante informar que na fase crônica da doença o diagnóstico parasitológico direto torna-se comprometido em virtude da ausência de parasitemia, neste caso, são indicados os métodos parasitológicos indiretos (xenodiagnóstico – ou hemocultura), todavia, apresentam baixa sensibilidade (20-50%). Assim, o diagnóstico na fase crônica é essencialmente sorológico e deve ser realizado utilizando-se dois testes de princípios metodológicos diferentes: um teste que apresenta elevada sensibilidade, como no caso do ELISA utilizando antígeno total ou frações semi-purificadas do parasito ou a Imunofluorescência, acompanhado de outro com elevada especificidade, como o teste de ELISA utilizando antígenos recombinantes específicos do *T. cruzi*, conforme descrito no fluxograma representado na Figura 9.

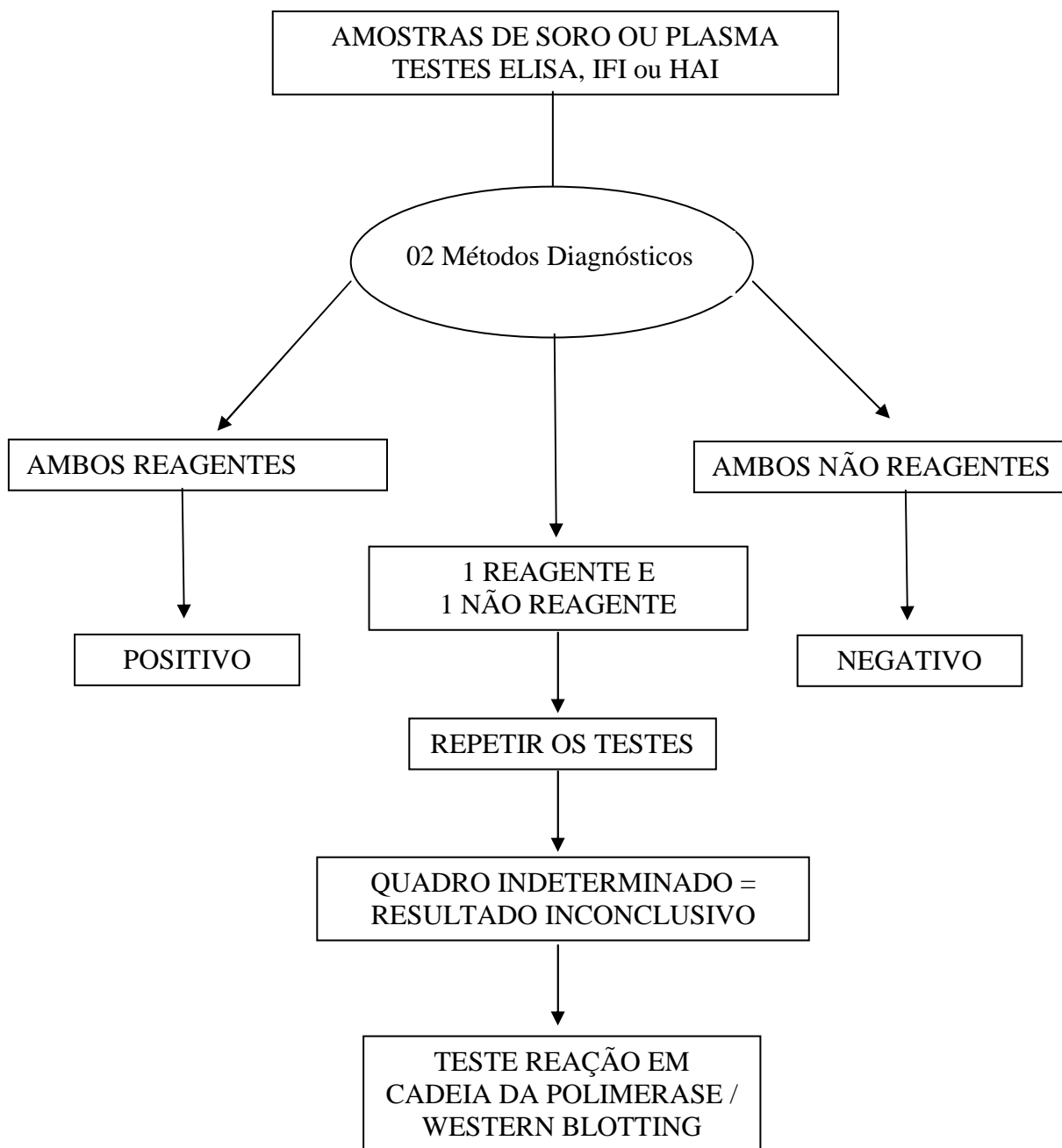


FIGURA 9. Fluxograma para a realização de testes laboratoriais para a Doença de Chagas na fase crônica. Fonte:(Adaptado de BRASIL, 2005).

A DOENÇA DE CHAGAS NO EXAME PRÉ-ADMISSÃO

Apesar do Brasil adotar medidas de combate ao *Triatoma infestans*, a doença de Chagas ainda é de alta prevalência, sendo importante causa de dias perdidos de trabalho, perda de produtividade por absenteísmo e elevado custo de assistência médica no tratamento de suas complicações (BONET et al., 2003).

Atualmente, no país, a posse em serviço público depende da avaliação da aptidão física e mental do candidato. Discute-se muito sobre o uso racional de exames complementares durante esse processo, dentre eles a solicitação de exames sorológicos para diagnóstico de doença de Chagas, referindo-se sobre a incapacidade laboral do portadores (SANTOS, 2006). Vale destacar que esta

solicitação de exames varia conforme região e áreas endêmicas para determinadas patologias.

O brasileiro com diagnóstico doença de Chagas na forma indeterminada (FI) frequentemente se encontra num limbo em relação ao mercado de trabalho e à Previdência Social, considerando que, por um lado, é discriminado quando de sua admissão por exames sorológicos positivos, e, por outro, onera a Previdência reivindicando benefícios que a lei lhe garante, mas que o retornam à base da pirâmide social da qual tentava sair com sua força de trabalho.

Estudos realizados por LANNI & MADI (1997) demonstraram que a partir da análise de 160 pacientes com FI durante 14 anos, submetidos a avaliações clínicas frequentes, monitorados por meio de eletrocardiograma semestrais e ecocardiogramas anuais, 21% desenvolveram alterações eletrocardiográficas, sendo apenas 9% atribuídas à doença de Chagas, já que envolviam achados mais característicos da doença, como bloqueios de ramo, dentre outros. Em 9% foram observadas alterações transitórias, com porcentagens superponíveis à população não chagásica, principalmente no que se refere às arritmias supraventriculares e ventriculares. E, em relação à fração de ejeção do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma, observados anualmente e até mais frequentemente quando necessário, manteve-se sempre dentro dos limites normais, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dados evolutivos, tanto no grupo sem alterações eletrocardiográficas como no grupo com alterações eletrocardiográficas, não mostrando diferença estatisticamente significativa. Estes estudos concluíram portanto que esses pacientes não devem ser impedidos de levar uma vida normal em todos os sentidos, inclusive no laborativo.

De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005), apesar da cardiopatia chagásica crônica constituir importante causa de incapacidade laborativa em algumas regiões do Brasil, pela benignidade da forma indeterminada, não se justifica a prática comum de solicitação de exames sorológicos no pré-admissional. Pois, nos casos de forma cardíaca da doença, o exame clínico minucioso, com especial atenção ao aparelho cardiovascular, refere-se ao componente básico da avaliação funcional. Nestes casos, demais exames complementares, devem ser solicitados segundo as especificidades da atividade laboral que o indivíduo irá exercer (SANTOS, 2006).

Assim, o exame admissional que inclui as reações sorológicas para Doença de Chagas apresenta elementos sugestivos de discriminação (WANDERLEY, 1998), devendo esta prática ser abolida. O fato das reações sorológicas serem positivas serve apenas como um alerta, não podendo impedir o indivíduo de exercer plenamente sua atividade, quando apresentar eletrocardiograma e estudo radiológico de tórax normais (LANNI & MADI, 1997). Entretanto, em casos de cardiopatia, é importante considerar as atribuições do cargo exercido, especialmente a necessidade de esforço físico intenso ou continuado nessa atividade. Estudo realizado por WANDERLEY (1998) constatou a existência de inadequação quanto a capacidade de trabalho dos portadores de doença de Chagas e a função desempenhada. Fatores como a idade do candidato também são relevantes, tendo em vista que a possibilidade de evolução da cardiopatia é maior quanto mais novo for o indivíduo e vice-versa. Portanto faz-se necessário a adoção de estratégias de esclarecimento aos profissionais da área de saúde referente a capacidade de trabalho dos portadores de infecção pelo *T.cruzi*, bem como os peritos da Previdência Social.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de se tratar de uma doença que pode ser adquirida por distintas vias de transmissão (vetorial, transfusional, congênita, acidentes laboratoriais e hospitalares, transplante de órgãos, transmissão oral, sexual e vetores não triatomíneos), o ambiente com a presença do hospedeiro intermediário ainda demonstra-se como a principal causa de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* no Brasil.

Diversos são os métodos diretos e indiretos utilizados para o diagnóstico e acompanhamento da doença de Chagas, seja na fase crônica ou aguda da patologia. Atualmente, o diagnóstico sorológico da infecção chagásica ainda apresenta limitações no que diz respeito à presença de resultados inconclusivos e falso-positivos (devido a reações cruzadas com outras parasitoses). O xenodiagnóstico e a hemocultura são considerados como padrão no diagnóstico, particularmente quando as provas sorológicas são inconclusivas, em pacientes imunodeprimidos e no controle pós-terapêutico. As técnicas de PCR empregam reagentes e aparelhagem dispendiosa e exigem treinamento especializado apresentando-se, no entanto, como uma alternativa no controle pós-terapêutico pela sua maior sensibilidade frente às provas parasitológicas indiretas por essas terem baixa sensibilidade com resultados negativos e por vezes inconclusivos após tratamento. Dada a sua elevada sensibilidade, para fins de estudos epidemiológicos, assim como para diagnóstico, a imunofluorescência indireta continua a ser usada até o presente, simultaneamente com a hemaglutinação indireta a ELISA, sendo que os três são considerados testes convencionais, com os quais há grande experiência em todos os países da América Latina.

Assim, fatores como custo-benefício, material disponível, agilidade no diagnóstico e a necessidade de busca do tratamento mais eficaz são essenciais na escolha do melhor método a ser aplicado. Além disso, a solicitação de reações sorológicas para Doença de Chagas em rotinas de exames admissionais são discriminativas, devendo esta prática ser abolida, considerando que um minucioso exame clínico comparado à atividade laboral são suficientes.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, I. C.; FERGUSON, M. A. J.; SCHENKMAN, S.; TRAVASSOS, L. R. Lytic anti- α -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 304, p. 793-802, 1994.

ANSA-ADDO, E.; INAL, J. *T. cruzi* interference with host cell membrane integrity triggers the release of Plasma Membrane-derived Vesicles: A mechanism for entry into mammalian cells. **The Journal of Immunology**, v. 184, 137.1, 2010.

AVILA, H.; BORGES-PEREIRA, J.; THIEMANN, O.; DE PAIVA, E.; DEGRAVE, W.; MOREL, C. M.; SIMPSON, L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2421-2426, 1993.

BONET, C.; BRANCO, T. P.; LARRUBIA, A. F. G.; TEIXEIRA, C. O.; TEIXEIRA, M. A. B.; CARVALHAL, S. S. Correlação Anatomoclínica: caso 1/03 - Homem, 27 anos, com sorologia reagente para doença de Chagas e antecedente de febre reumática

há 11 anos (Pontifícia Universidade Católica - Campinas, SP). **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 80, n. 2, p. 220-223, 2003.

BRASIL, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro de Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 38, suplemento III, p. 1-29, 2005.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, p. 347-382, 1973.

BRENER, Z.; ALVARENGA, N. J. **Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the vector**. In: New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Sci Publ, 318. Pan American Health Organization, Washington DC, p. 83-88, 1976.

BRENER, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Advances in Parasitology**, v. 18, p. 247-292, 1980.

BRITTO, C.; SILVEIRA, C.; CARDOSO, M. A.; MARQUES, P.; LUQUETTI, A.; MACEDO, V.; FERNANDES, O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 823-826, 2001.

BRODSKYN, C. I.; SILVA, A. M. M.; TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunology & Cell Biology**, v. 67, p. 343, 1989.

CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 219-275, 1911.

DIAS, J. C. P. Acute Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 17-26, 1984.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Epidemiologia**. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (eds). Clínica e Terapêutica da doença de Chagas. Ed. Fiocruz. Rio de Janeiro, 1997.

DUFFY, T.; BISIO, M.; ALTCHEH, J.; BURGOS, J. M.; DIEZ, M.; LEVIN, M. J.; FAVALORO, R. R.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A. G. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. 419, 2009.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Editora Guanabara Koogan, 2ª. ed., Rio de Janeiro, 2001.

FUCHS, A. P.; FIORATTI, V. L.; MELLO, V. A.; BOAINAIN, E. Diagnóstico sorológico na doença de Chagas. Estudo comparativo de diferentes técnicas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, p. 242-245, 1980.

GADELHA, A. A. M.; VERÇOSA, A. F. A.; LORENA, V. M. B.; NAKAZAWA, M.; CARVALHO, A. B.; SOUZA, W. V.; FERREIRA, A. G. P.; SILVA, E. D.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; GOMES, Y. M. Chagas' disease diagnosis: comparative

analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and hemagglutination test. **Vox Sanguinis**, v. 85, p. 165-170, 2003.

GOMES, Y. M. **Diagnóstico Etiológico**. In: Malta J. (Org). Doença de Chagas. São Paulo: Editora Savier, p. 119-132, 1996.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104 supl.1, 2009.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 128, p. 2009, 1982.

LANNI, B. M.; MADY, C. A Forma Indeterminada da Doença de Chagas. Mitos vs Fatos. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 68, p. 3, 1997.

LUQUETTI, A. O, RASSI, A. **Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi***. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M (org.), *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 344-348, 2000.

LUZ, Z. M. P.; COUTINHO, M. G.; CANÇADO, J. R.; KRETTLI, A. U. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 143-148, 1994.

MARTINS-FILHO, A. O; PEREIRA, M. E. S.; CARVALHO, J. F.; CANÇADO, J. R, BRENER, Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, p. 569-573, 1995.

MARTINS-FILHO, A. O.; SANTOS, S. M. E. C.; TEIXEIRA, A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; RASSI, A.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, G. G.; BRENER, Z. Double-blind study to evaluate flow cytometry analysis of anti-live trypomastigote antibodies for monitoring treatment efficacy in cases of human Chagas' disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 1107-1113, 2002.

MORGADO, M. G.; IVO-DOS-SANTOS, J.; PINHO, R. T.; ARGÜELLES, E.; REZENDE, J. M.; GALVÃO-CASTRO, B. *Trypanosoma cruzi*: identification of specific epimastigote antigens by human immune sera. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 309-314, 1989.

MOTA, I.; UMEKITA, L. F. The effect of C3 depletion on the clearance of *T. cruzi* induced by IgG antibodies. **Immunology Letters**, v. 21, p. 223-226, 1989.

RASSI, A. **Clinical features**. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI, A. (Eds). Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo: Editora Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, p. 81-101, 1992.

SANCHEZ, G.; CORONADO, X.; ZULANTAY, I.; APT, W.; GAJARDO, M.; SOLARI, S.; VENEGAS, J. Monitoring the efficacy of specific treatment in chronic Chagas disease by polymerase chain reaction and flow cytometry analysis. **Parasite**, v. 12, p. 353-357, 2005.

SANTOS, J. A. M. **Papel do perito no custo-benefício do exame pré-admissional no serviço público**. Monografia (Especialização em Perícia Médica). Programa de Pós Graduação Lato Senso em Perícia Médica da Universidade Gama Filho e Universidade Unimed, Brasília, 2006.

SOUZA, F. F.; CASTRO-E-SILVA, O.; MARIN-NETO, J. A.; SANKARANKUTTY, A. K.; TEIXEIRA, A. C.; MARTINELLI, A. L.; GASPAR, G. G.; MELO, L.; FIGUEIREDO, J. F.; ROMANO, M. M.; MACIEL, B. C.; PASSOS, A. D.; ROSSI, M. A. Acute chagasic myocardopathy after orthotopic liver transplantation with donor and recipient serologically negative for *Trypanosoma cruzi*: a case report. **Transplantation Proceedings**, v. 40, p. 875-878, 2008.

TEIXEIRA, A. R.; SANTANA, J. M. *Trypanosoma cruzi*: endocytosis and degradation of specific antibodies by parasite forms. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 40, n. 2, p. 165-170, 1989.

TOMLINSON, S.; PONTES DE CARVALHO, L. C.; VANDEKERCKHOVE, F.; NUSSENZWEIG, V. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **The Journal of Immunology**, v. 153, p. 3141-3147, 1994.

UMEKITA, L. F.; TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. **Immunology Letters**, v. 17, p. 85-89, 1988.

VOLLER, A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. **Lancet**, v. 22, p. 426-428, 1975.

WANDERLEY, J. S. **Aspectos médicos trabalhalistas de pacientes chagásicos com vínculo empregatício**. Tese (Doutorado) Programa de Pós Graduação da Universidade Estadual de Campinas. 85 f. 1998

WHO. Chagas disease (*American trypanosomiasis*). Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em Maio de 2012.

ZULANTAY, I.; HONORES, P.; SOLARI, A.; APT, W.; ORTIZ, S.; OSUNA, A.; ROJAS, A.; LÓPEZ, B.; SÁNCHEZ, G. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 48, p. 253-257, 2004.