

Nº 15 - Ano 4
Fev/Abr 2015

Analisando

Informe Técnico



**Técnicas para diagnóstico
da Doença de Chagas.**



Doença de Chagas.

Augusto C. P. de Jesus
Grazielle L. N. Lima
Ana Carolina C. Menezes

Acadêmicos do curso de Biomedicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Cristiane Menezes

Professora da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é o agente causador da Doença de Chagas ou tripanossomíase americana, uma doença endêmica nas Américas Central e do Sul e que foi descoberta pelo cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909. Este pesquisador descreveu a doença, o agente etiológico, os insetos transmissores além dos reservatórios domésticos e silvestres. O ciclo de transmissão da doença de Chagas está representado na **figura 1**.

A infecção pelo *T. cruzi* pode se dar por via vetorial, via oral, transfusional, através de transplante de órgãos, transmissão congênita ou acidental. Após a infecção pelo *T. cruzi*, o indivíduo entra em uma fase aguda, caracterizada pela presença de parasitos no sangue periférico, podendo apresentar ou não sintomas como febre, fraqueza e algum chagoma de inoculação. Após um período que pode variar de 2-4 meses, através da ação do sistema imune, a parasitemia é controlada e o indivíduo infectado entrará na fase crônica da doença de Chagas. A fase crônica pode ser assintomática (forma indeterminada) ou sintomática, acometendo órgãos do sistema cardiovascular e/ou digestórios (formas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva).

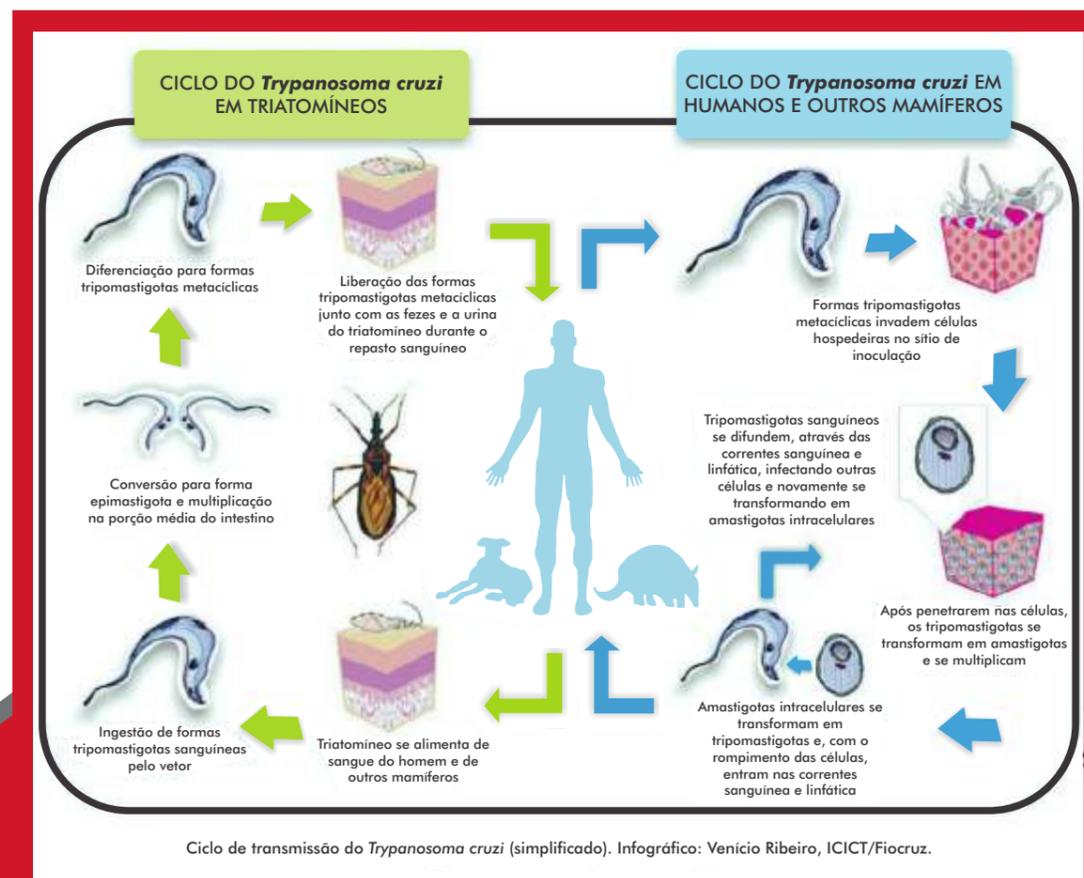
A forma de diagnóstico durante a fase aguda é a detecção de parasitos circulantes em exames parasitológicos diretos de sangue periférico (exame a fresco, esfregaço, gota espessa) e a presença de anticorpos IgM anti-*T. cruzi* no sangue. Na fase crônica, o diagnóstico é feito pela detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* por três testes sorológicos de princípios distintos, sendo a Imunofluorescência Indireta (IFI), a Hemaglutinação (HE) e o ELISA os métodos recomendados.

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de transmissão da Doença de Chagas pelo *Trypanosoma cruzi*.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença de Chagas acomete aproximadamente 10 milhões de pessoas e cerca de 120 milhões estão sob o risco de infecção. Para confirmar a suspeita clínica da doença e triagem nos bancos de sangue, testes sorológicos são utilizados. Os métodos de hemaglutinação e imunoensaio enzimático são bastante utilizados para o diagnóstico da doença de Chagas e serão descritos a seguir.

HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA

As hemácias estão entre os melhores suportes de antígenos para os testes de aglutinação. Na hemaglutinação indireta

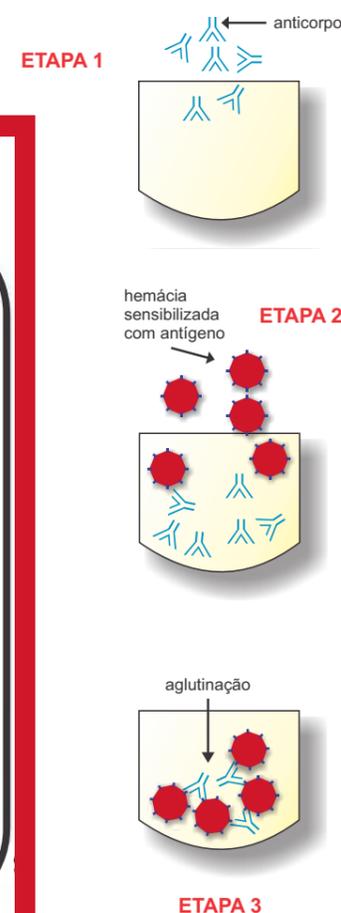


Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

(HAI) elas são suportes para antígenos que são adsorvidos à sua superfície, que para doença de Chagas são antígenos de *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença. São usadas hemácias de aves que podem ser fixadas em formaldeído ou glutaraldeído o que soluciona o problema da fragilidade e da estocagem por longos períodos de tempo. Uma vez na presença de glutaraldeído, após tratamento com ácido tânico, essas hemácias expõem cargas residuais e adsorvem as proteínas e glicoproteínas com elevada estabilidade, aumentando a quantidade de proteína adsorvida e tornando maior a sensibilidade do sistema. Empregando antígenos purificados obtém-se maior sensibilidade e especificidade.

É utilizada uma placa de microtitulação com fundo em V, onde se adiciona a amostra, que se for reagente conterá anticorpos anti-*T. cruzi*. Adiciona-se também os controles positivo e negativo e as hemácias sensibilizadas com antígeno aos poços onde foram adicionados os três itens anteriores separadamente.

Figura 2 - Representação esquemática da reação de hemaglutinação indireta (HAI).



A positividade do teste pode ser visualizada a olho nu e os critérios de determinação da reatividade são:

Amostra reagente: hemácias distribuídas de maneira homogênea, em forma de tapete ou manto, formado pela malha de imunocomplexos Antígeno-Anticorpo, ocupando área maior do que 50% do fundo da placa.

Amostra não reagente: hemácias acumuladas em formas de botão no fundo do poço.

Amostra indeterminada: qualquer padrão diferente dos anteriores. Esses três critérios estão demonstrados na **figura 3**.

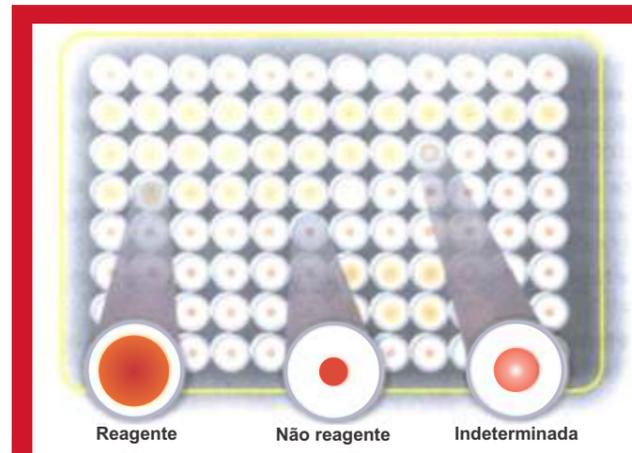


Figura 3 - Esquema de visualização da reatividade das amostras na HAI.

O teste pode ser semi-quantitativo, titulando a presença de anticorpos utilizando diluições seriadas com o diluente. **A placa e todos os reagentes necessários estão presentes no kit CHAGAS - HAI - CAT. 510, comercializado pela Gold Analisa.**

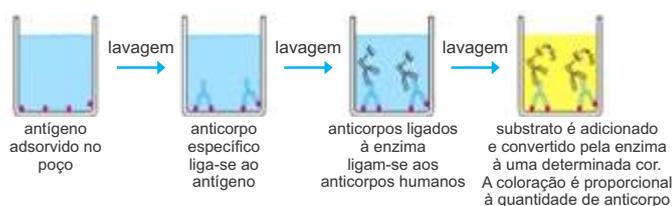
ELISA

O teste de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) é amplamente utilizado para realizar o diagnóstico da Doença de Chagas, pois apresenta elevada sensibilidade, especificidade, rapidez e baixo custo. Existem dois tipos de teste de ELISA: o indireto e o sanduíche, sendo que para diagnosticar a doença de Chagas é realizado o teste indireto (**Figura 4**). Esta técnica consiste em detectar anticorpos

contra o parasito, *Trypanosoma cruzi*, através da utilização de um segundo anticorpo (anti-imunoglobulina humana produzido em animais de laboratório) conjugados à enzimas, que em presença de substratos específicos geram produtos coloridos, cuja quantificação é feita espectrofotometricamente. A reação pode ser avaliada como reagente, não reagente ou indeterminada a partir da absorbância (ou densidade óptica) obtida pelo espectrofotômetro em comparação ao *cut-off* (ponto de corte). Amostras com valores acima do *cut-off* são consideradas positivas, abaixo negativas e amostras com valores em torno do *cut-off*, chamada de zona cinza (*borderline*), são consideradas indeterminadas e não se pode ter certeza do resultado.

Este teste pode ser utilizado em larga escala devido à sua possibilidade de automatização como, por exemplo, o uso do sistema VIDAS e o IMX. Sendo assim, o teste apresenta maior reprodutibilidade, com menor chance de erros.

Figura 4 - Etapas de realização do ELISA indireto.



CONCLUSÃO

Este estudo aponta dois tipos de técnicas utilizadas para diagnóstico da doença de Chagas, são elas: **HEMAGLUTINAÇÃO** e **ELISA**. Esses métodos possuem alta sensibilidade e especificidade na pesquisa de anticorpos específicos, se comparado com outros testes que também são utilizados para o diagnóstico dessa doença, como **IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA**.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, Bethânia Ribeiro de; Santiliano, Fabiano Costa. Levantamento dos métodos de diagnóstico para a doença de Chagas. Editora Biosfera (2012).
- Bertho, Álvaro Luiz; Citometria de fluxo. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Doença de Chagas – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. – Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 76. p. :11 (1998).
- Rocha, M.O., Ribeiro, A.L., Teixeira, M.M. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 5(4), 727–743 (2007).
- Vaz, Adelaide J. Imunoensaios Fundamentos e Aplicações. Editora Eletrônica.
- World Health Organization. Control of Chagas disease. Tech. Rep. Ser. 905 i109. (2002).
- http://www.uft.edu.br/parasitologia/pt_BR/exames/rea%C3%A7%C3%B5es_de_aglutina%C3%A7%C3%A3o/rea%C3%A7%C3%A3o+de+hemaglutina%C3%A7%C3%A3o/index.html

 **Analisa**
Analisando suas reações

Gold Analisa Diagnóstica Ltda

Av. Nossa Senhora de Fátima, 2.363, Carlos Prates
Belo Horizonte - MG - Brasil - CEP 30710-020
Tel.: + 55 31 3272-1888 / Fax: + 55 31 3271-6983
SAC: 0800 703 1888 - sac@goldanalisa.com.br