

A origem geográfica de pessoas com a doença de Chagas crônica no Brasil impacta o desempenho de testes comerciais para IgG anti-T. Cruzi

Artículo original en: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000500002>

AUTORES

Amadeo Sáez-Alquezar, Angela Cristina Verissimo Junqueira², Andressa da Matta Durans^{3,4}, André Valpassos Guimarães¹, José Abol Corrêa¹, José Borges Pereira², Patrícia Lago Zauza², Pedro Hernan Cabello^{5,6}, Pedro Albajar-Viñas⁷, David William Provance Jr^{3,4}, José Rodrigues Coura²

- 1) Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Programa Nacional de Controle de Qualidade, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- 2) Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Doenças Parasitárias, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- 3) Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- 4) Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- 5) Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Genética Humana, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- 6) Universidade do Grande Rio, Laboratório de Genética, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- 7) Organização Mundial da Saúde, Departamento de Controle de Doenças Tropicais Negligenciadas, Genebra, Suíça

RESUMO

FUNDAMENTO

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, afeta quase seis milhões de pessoas em todo o mundo. Vários testes sorológicos foram desenvolvidos para o diagnóstico desta infecção.

OBJETIVO

Examinar o desempenho de um conjunto de ensaios imunológicos comerciais em relação à origem geográfica de amostras de pacientes, comparando quatro estados do Brasil: Amazonas (AM), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG) e Piauí (PI).

MÉTODOS

Foram empregados sete imunoensaios para detectar anticorpos IgG anti-T. cruzi em 379 amostras de pacientes que haviam sido previamente diagnosticados utilizando o protocolo de duas etapas exigido pelo Ministério da Saúde.

RESULTADOS

Foi encontrada uma variação significativa de percentual reativo para as amostras do AM e de MS, enquanto nos estados do PI e de MG apresentaram uma variação significativa no percentual não reativo. O índice médio de reatividade foi significativamente maior para amostras dos estados do PI e de MG do que para o AM e MS.

PRINCIPAIS CONCLUSÕES

Na visão global, todos os testes apresentaram resultados satisfatórios. No entanto, pode-se observar variações associadas à região de origem das amostras. Nossas análises sugerem que o futuro das avaliações dos imunoenaios poderiam incluir pelo menos uma amostragem sorológica representativa da região onde o teste será aplicado, além da utilização das amostras de Padrões Internacionais de Referência Biológicas disponíveis.

PALAVRAS-CHAVE

Trypanosoma cruzi; doença de Chagas humana; teste diagnóstico sorológico; imunoenaios; Padrões Internacionais de Referência Biológica

A doença de Chagas é uma doença tropical causada por infecções pelo parasita *Trypanosoma cruzi*. É considerada endêmica em 21 países da América Latina e estimativas atuais sugerem que cerca de seis milhões de pessoas estão infectadas com cerca de 14.000 mortes por ano atribuídas à infecção.¹ O modo clássico de transmissão é através das fezes contaminadas do triatomíneo depositadas após a picada para sugar sangue.² Este vetor é característico de regiões endêmicas, mas existem outras formas de transmissão que incluem transfusão de sangue, transplantes de órgãos, transmissão congênita e oral através da ingestão de sucos recém-preparados e alimentos contaminados com insetos infectados.^{1,3} A transmissão por acidentes laboratoriais também é possível, embora limitada a um conjunto restrito de profissionais.

Tem sido feitos intensos esforços para reduzir a taxa de infecções em regiões endêmicas por meio de medidas de controle dos insetos vetores.^{1,4,5} O grande sucesso desses programas foi a interrupção da transmissão pelo *Triatoma infestans*, principal inseto vetor no Brasil, Uruguai e Chile.^{6,7,8} Nos demais países endêmicos, a interrupção da transmissão pelo *T. infestans* ainda está em curso. No entanto, nas últimas décadas, houve um contingente de migrações de áreas endêmicas para áreas não endêmicas, incluindo outros continentes, que representam o surgimento de novos riscos para alguns setores dos países e regiões, que os receberam, como a transfusão de sangue e transplante

de órgãos, bem como a ocorrência da doença de Chagas congênita. Os inúmeros esforços realizados nas últimas décadas por instituições governamentais e entidades internacionais contribuíram significativamente para a redução das taxas de transmissão vetorial e por transfusão de sanguínea. Ações mais recentes têm sido direcionadas para a interrupção da transmissão vertical de mães infectadas para recém-nascidos e para o tratamento de pessoas infectadas, tanto em crianças quanto em adultos na fase crônica da doença.

Para controlar todas essas ações, o uso de testes sorológicos é essencial para identificar corretamente pessoas infectadas com *T. cruzi* e também casos específicos, como no diagnóstico de recém-nascidos ou na avaliação da eficácia terapêutica ou da eficiência dos testes moleculares. Dados na literatura sugerem que menos de 10% das pessoas infectadas em áreas endêmicas são diagnosticadas.^{9,10,11} Considera-se que a expansão da testagem nas populações em situação de risco, como mulheres em idade fértil em áreas endêmicas, pode beneficiar ações subsequentes de prevenção e tratamento.

Há uma ampla gama de testes sorológicos comerciais disponíveis no mercado internacional que empregam metodologias antigas e novas. Cada abordagem tem suas vantagens e desvantagens que podem direcionar a escolha para o uso adequado em diferentes situações de acordo com o acesso aos recursos disponíveis.^{12,13,14,15,16} Dentro dos chamados testes convencionais, há ensaios para a Hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) que utilizam o lisado de parasitas (extrato total) e/ou frações antigênicas. Atualmente, a metodologia de ELISA emprega frações antigênicas, proteínas recombinantes (rec) e/ou peptídeos sintéticos (ps). Além disso, outros testes usam quimioluminescência e eletroquimioluminescência (CMIA/eCLIA) em combinação com tipos similares de frações antigênicas de rec e ps. Por fim, existem testes de diagnósticos rápidos (TDR) que podem ser extremamente úteis em circunstâncias cada vez mais frequentes devido à rapidez para obter os resultados e às melhorias observadas na qualidade, ao longo do tempo, tanto na especificidade quanto na sensibilidade.

Outras possibilidades diagnósticas são o uso de testes parasitológicos diretos (TPD) e indiretos (TPI), que dependem da presença de parasitas circulantes na amostra biológica a ser analisada. Os TPDs são indispensáveis nos casos da doença de Chagas na fase aguda, pois não há distinção entre anticorpos específicos *anti-T. cruzi* gerados na fase

aguda e posteriormente durante a fase crônica.¹⁷ No entanto, esse tipo de análise depende muito do treinamento e experiência do técnico responsável pela avaliação dos esfregaços sanguíneos. Em vez de observar diretamente os parasitas, as técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) podem ser usadas para amplificar segmentos do genoma do parasita. Embora dependa da presença de parasitas circulantes, o volume de sangue que pode ser preparado para análise é maior do que o utilizado num esfregaço de sangue. Considerando a sensibilidade das reações de PCR, essa abordagem tem sido útil em certas circunstâncias como na identificação do Chagas congênito.

O desenvolvimento de protocolos a nível internacional tem melhorado muito a padronização das técnicas de PCR permitindo uma utilização mais ampla nos laboratórios de análises clínicas.

No geral, os testes sorológicos têm maior potencial para serem aplicados na escala necessária para combater o impacto das infecções por *T. cruzi* na sociedade global. No entanto, até o momento, nenhum teste único atendeu ao perfil de desempenho necessário para ser considerado um "padrão-ouro". Em análise prévia do desempenho dos testes comerciais,¹³ foram aplicados os Padrões Biológicos Internacionais da OMS para mostrar uma diferença com base nas duas regiões geográficas, referentes aos dois *pools* (NIBSC 09/186 e NIBSC 09/188). No Brasil, devido às suas dimensões continentais, postulamos que poderia haver diferenças no comportamento dos testes sorológicos em relação às diferentes regiões do país. As variâncias podem refletir vários fatores, como a diversidade genética do agente infectante e as condições clínicas dos indivíduos infectados. Aqui, apresentamos nossa análise sobre a realização de oito testes sorológicos em amostras de soro de indivíduos com diagnóstico sorológico prévio da doença de Chagas crônica (DCC), ou não, que vivem em quatro estados do Brasil, Amazonas, Piauí, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul onde a enfermidade é endêmica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações éticas para o uso do soro humano - Todas as amostras sorológicas dos pacientes utilizadas no presente estudo foram previamente obtidas de pessoas que participaram de estudos epidemiológicos seccionais e longitudinais realizados nas áreas referidas em intervalos de 9 a 13 anos.^{18,19,20} Todas as coletas de amostras e uso de experimentos foram pré-aprovadas pelo comitê de

ética do Instituto Oswaldo Cruz da FIOCRUZ (CEP 289/05 e Protocolo nº 0019.0.009.000-07).

Amostras de Pacientes - Quatro estados do Brasil foram escolhidos para representar as regiões geográficas: Norte (Amazonas - AM), Nordeste (Piauí - PI), Sudeste (Minas Gerais - MG) e Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul - MS) (Fig. 1). Foram coletadas amostras sorológicas nos municípios de Barcelos no AM (n = 79), João Costa no PI (n = 100) e Virgem da Lapa em MG (n = 100). Em MS, foram realizadas coletas no Distrito Sanitário de Rio Verde que abrange Alcinoópolis (n = 11), Bandeirantes (n = 09), Camapuã (n = 20), Corguinho (n = 05), Coxim (n = 18), Pedro Gomes (n = 07), Rio Negro (n = 06), Rio Verde (n = 11), Rochedo (n = 02), São Gabriel (n = 08), Sonora (n = 02) e Jaraguari (n = 01). As idades médias dos participantes dos quatro estados (AM, PI, MG e MS) foram de 33, 58, 56 e 55 anos, respectivamente. A proporção entre mulheres e homens foi de 43:57 em AM, 56:44 em PI e 63:37 em MG e MS.

Ensaio diagnóstico para detecção de anticorpos específicos de T. cruzi - No momento da coleta, todos os soros foram avaliados no Laboratório de Doenças Parasitárias (LPD) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz-RJ (FIOCRUZ) utilizando dois protocolos independentes, conforme estabelecido pelo Ministério da Saúde²¹, que empregou kits de IFI chagas (Biomanguinhos, Biomanguinhos, RJ, Brasil) composto por formas de



Figura 1: Croqui do mapa do Brasil mostrando os locais de coleta dos soros de pacientes com os estados sombreados (AM - Amazonas; PI - Piauí; MG - Minas Gerais; MS - Mato Grosso do Sul).

epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em triptona de infusão hepática e ELISA Chagas 3.0 (Laboratório Wiener, Argentina) contendo antígenos recombinantes. Ambos os testes foram utilizados antes da data de validade. As amostras foram armazenadas a -20°C até o início do estudo atual. Um subconjunto de 100 amostras do painel de soro originárias de PI, MG e MS foram escolhidas aleatoriamente, enquanto todas as 79 amostras disponíveis do estado de AM foram utilizadas. Os soros foram processados no laboratório do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ-RJ) e analisados pelos oito testes sorológicos (Tabela I). Seis kits foram baseados na metodologia ELISA (Gold; Biochile; Biokit; D-Med; BioMérieux; Wiener 4.0), um deles usou quimioluminiscência com esferas magnéticas (CMIA; Abbott Architect) e o outro usou um formato de Western Blot (TESA Blot, BioMérieux). Todos os testes foram realizados de forma cuidadosa seguindo as instruções do fabricante e dentro do prazo de validade. Atualmente, o kit BioMérieux ELISA foi descontinuado. Para os experimentos de ELISA, foi utilizada uma lavadora automática de placas de Columbus Microplate Washer (TECAN, Männedorf, CH) e um leitor SUNRISE™ ELISA (TECAN) para a medição de densidades ópticas. Os imunoenaios magnéticos quimioluminescentes foram realizados em uma plataforma automatizada Architect i2000 (Abbott, Illinois, EUA).

Análise estatística - As diferenças nas proporções dos resultados qualitativos das amostras foram submetidas ao teste qui-quadrado de Mantel-Haenszel e as diferenças das médias do índice de reatividade (DO/CO) dos testes foram submetidas à análise de variância (ANOVA) Bidirecional,²² que considerou os efeitos individuais sobre DO/CO entre os ensaios comerciais, a região geográfica de onde provinham as amostras (estados do Brasil) e a interação entre essas duas variáveis. Em ambas as análises estatísticas, considerou-se nível de confiança de 95% para um $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Um estudo prévio de epidemiologia longitudinal e seccional proporcionou uma oportunidade única para avaliar o desempenho de oito testes disponíveis comercialmente para a detecção de anticorpos *anti-T. cruzi* no soro de pacientes com suspeita da doença crônica de Chagas provenientes de quatro regiões geográficas diferentes (estados) do Brasil. Para representar as áreas cobertas pelos estados do PI, MG e MS, foram escolhidas 100 amostras aleatórias que

TABELA I.

Lista dos testes comerciais utilizados, seu formato e os componentes utilizados para capturar anticorpos anti-Trypanosoma cruzi

ELISA: ensaio imunoenzimático; CMIA: imunoenensaio de quimioluminiscência; WB:Western Blot; Lys: lisado total de T.cruzi; Rec.: proteínas recombinantes (T. Cruzi); Ag Trypo: antígenos excretados ou secretados por formas de tripomastigotas de T. cruzi. N/A: não aplicável.

TESTE COMERCIAL	MÉTODO	ALVO ANTIGÊNICO	LOTE	LEITOR/ANALISADOR
GOLD	ELISA	Lys + Rec	CHA084 A	TECAN
BIOSCHILE	ELISA	Lys	1H11038 8	TECAN
D-MED	ELISA	Lys	110102	TECAN
BIOMÉRIEUX	ELISA	Lys	12031060 06	TECAN
BIOKIT	ELISA	Rec	L-1411	TECAN
WIENER	ELISA	Rec	11090751 60	TECAN
ABBOTT/ARCHITECT	CMIA	Rec	14857LI0 0	Architect i2000
TESA BLOT (BIOMÉRIEUX)	WB	Ag Trypo	12041061 50	N/A

constavam como identificadores nos registros de soro na análise diagnóstica inicial dos soros realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias do IOC/Fiocruz-RJ. Foi utilizada abordagem semelhante para representar a área AM com o número de amostras restritas a 79. No total foram analisadas 379 amostras de pacientes.

A seleção incluiu amostras reagentes (soropositiva por dois ensaios) e não reagentes (soronegativa por ambos os ensaios) para infecção por *T. cruzi*, bem como amostras indeterminadas que tinham sido reagentes por um teste e não reagentes pelo outro. A Tabela II mostra a distribuição por estado do Brasil para as 234 amostras reagentes, 109 não reagentes e 36 indeterminadas. A partir dessa análise inicial, foram encontradas prováveis diferenças percentuais entre os grupos de amostras soropositivas, soronegativas e soros divergentes de acordo com a área de origem. O maior percentual de resultados indeterminados foi encontrado para amostras coletadas de pacientes no estado do Amazonas e o menor foi para aquelas coletadas no Piauí.

Quando o painel de soros foi testado no presente estudo pelos sete kits disponíveis comercialmente, 221 continuaram a apresentar reatividade na maioria dos testes (Tabela III). Isso se traduz em 94,4% das 234 amostras diagnosticadas como reagentes no diagnóstico inicial. Das 109 amostras não reagentes, 104 (95,4%) também não foram reagentes nos testes do perfil sorológico nos kits comerciais. Para corroborar esses resultados foi utilizado um outro ensaio com formato diferente, o TESA Blot, como teste complementar. Com relação ao número de amostras consideradas reagentes, 95,9% foram validadas por manter sua reatividade

ao longo do tempo de armazenamento. Estatisticamente, os percentuais de 88,9% em AM para 97,6% em PI e MS não apresentaram significativas ($X^2 = 1,767$; $p = 0,183$). Nas 36 amostras indeterminadas, 16 (44,4%) foram negativas na maioria dos testes comerciais e 20 (55,6%) apresentaram reatividade (dados não apresentados). No geral, parece que o título de anticorpos nas amostras dos pacientes não diminuiu em comparação com a reatividade dos testes iniciais dos kits sorológicos tratados em grupo.

Considerando o percentual de amostras que apresentaram reatividade positiva para *anti-T. cruzi* IgG de cada teste comercial nas 234 amostras biológicas para o diagnóstico inicial (Fig. 2), observa-se que os valores oscilaram desde 83,8% a 94,0% entre os kits (Tabela IV). As diferenças nas amostras reagentes foram estatisticamente significantes ($X^2 = 17,521$; $p = 0,000030$), o que indicou níveis diferentes de sensibilidade para os diferentes testes. Tomando como referência os resultados da sorologia na fase inicial, foi realizada uma análise dos percentuais de reagentes (sensibilidade) dos testes do perfil sorológico segundo a área de origem das amostras. Diferenças significativas nos valores foram obtidas com as amostras dos estados AM e MS, indicando diferentes sensibilidades dos testes nessas áreas. Em contrapartida, os percentuais obtidos nos estados de PI e MG não apresentaram diferença significativa, com destaque para os valores de 100% para todos os testes em MG, indicando desempenho igual na sensibilidade dos testes aplicados nessa área.

TABELA II.

Diagnóstico inicial de amostras de pacientes usando dois protocolos de ensaios independentes.

* - origem das amostras por estado do Brasil (AM - Amazonas; PI - Piauí; MG - Minas Gerais; MS - Mato Grosso do Sul); IFI - imunofluorescência indireta; ELISA - ensaio imunoenzimático; (+) reagente; (-) não reagente.

TESTES	AM* N (%)	PI* N (%)	MG* N (%)	MS* N (%)	TOTAL N (%)
IFI (+) & ELISA (+)	41 (52%)	86 (86%)	64 (64%)	43 (43%)	234 (61.7%)
IFI (-) & ELISA (-)	15 (18.9%)	14 (14%)	28 (28%)	52 (52%)	109 (28.7%)
IFI (+) & ELISA (-)	17 (21.5%)	0	8 (8%)	5 (5%)	30 (7.9%)
IFI (-) & ELISA (+)	6 (7.6%)	0	0	0	6 (1.7%)
TOTAL	79	100	100	100	379

TABELA III.

Porcentagem das amostras reagentes por imunoenaios na maioria dos testes comerciais e sua detecção pelo TESA Blot

Estado de origem amostral	Número de amostras	Número de reagentes (%)	Número (%) de reagentes para TESA-BLOT
Amazonas	79	27 (65.8%)	24 (88.9%)
Piauí	100	82 (95.3%)	80 (97.6%)
Minas Gerais	100	70 (91.4%)	67 (95.7%)
Mato Grosso do Sul	100	42 (97.6%)	41 (97.6%)
Totais	379	221 (94.4%)	212 (95.9%)

Para especificidade, foi determinado o percentual de resultados não reagentes das 109 amostras em relação ao número de amostras não reagentes da análise inicial (Fig. 3). A análise do percentual de não reagentes (especificidade) dos testes revela 100% para todos os testes nas amostras de AM; diferença significativa nos valores de PI e MG, e em MS apenas o teste ABBOTT mostrou-se significativamente menor em comparação com os outros testes (Fig. 3). Obteve-se uma diferença estatisticamente não significativa ($X^2 = 3,193$; $p = 0,073$), apesar do menor valor do teste CMIA do Laboratório ABBOTT, sugerindo que a matriz de testes comerciais apresentou um nível semelhante de especificidade.

Para avaliar melhor o desempenho de cada teste sorológico em relação à origem geográfica das amostras sorológicas, os valores médios de seus índices reagentes foram determinados pela razão entre a densidade óptica (DO) e o *cutoff* (ponto de corte) e a dispersão traçada segundo o grupo de estados (Fig. 4). Cinco dos testes comerciais apresentaram valores mais elevados em amostras procedentes de PI e MG que foram significativamente menores em amostras de AM e MS indicando uma diferença regional em seu desempenho para medir os níveis de anti-*T. cruzi* IgG. Dois dos testes comerciais apresentaram índices de reatividade menores em PI e MS que estavam na faixa dos outros cinco kits em AM e MS.

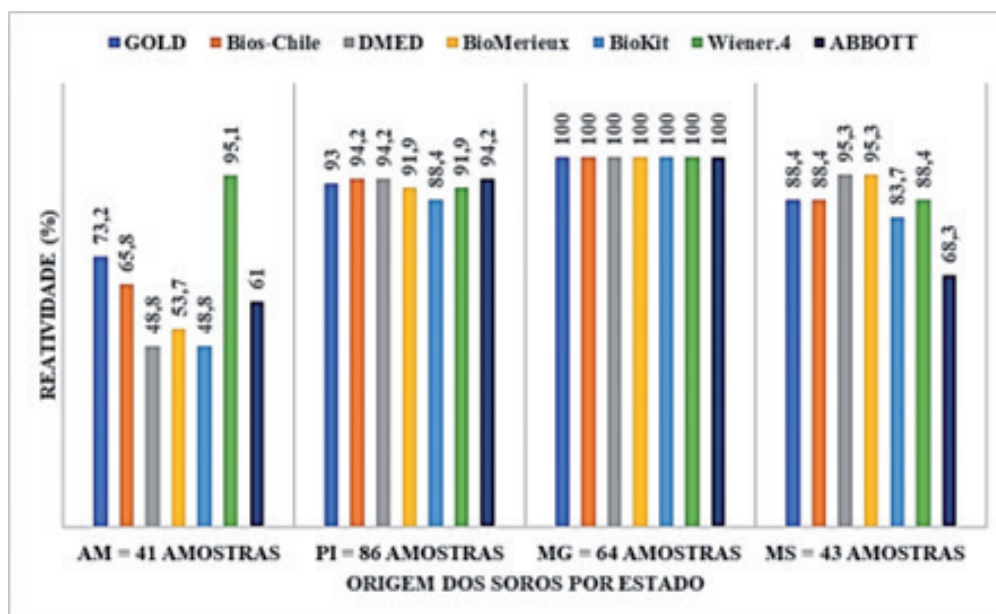


Figura 2:

Percentuais de testes comerciais reagentes para anti-*Trypanosoma cruzi* IgG nas amostras sorológicas para o diagnóstico inicial de acordo com o estado brasileiro onde foram realizados. O painel de soros determinou ser positivo para o anti-*T. cruzi* IgG pelo protocolo de duas etapas e seus reagentes (%) em cada um dos kits comerciais para o anti-*T. cruzi* IgG para o estado de origem das amostras biológicas. MG - Minas Gerais; PI - Piauí; MS - Mato Grosso do Sul; AM - Amazonas.

TABELA IV.

Número de soros reagentes e não reagentes de acordo com os testes comerciais individuais em relação ao diagnóstico inicial.

(*) a partir do diagnóstico inicial, 234 soros foram positivas e 109 negativos.

Teste comercial	Número reagente (% do diagnóstico inicial*)	Número não reagente (% do diagnóstico inicial)
Gold	212 (90.6)	104 (95.4)
Bios-Chile	210 (89.7)	106 (97.3)
DMED	206 (88.0)	102 (93.6)
BioMerieux	206 (88.0)	104 (95.4)
BioKit	196 (83.8)	101 (92.7)
Wiener 4	220 (94.0)	104 (95.4)
ABBOTT	198 (84.6)	86 (78.9)
Análise estatística	$X^2 = 17.521$; $p = 0,00003$	$X^2 = 3.193$; $p = 0,073$

Discussão

A realização prévia de estudos clínico-epidemiológicos seccionais e longitudinais sobre a doença crônica de Chagas nos estados de AM, PI, MG e MS proporcionou uma excelente base para o presente estudo. Gerou um painel de soros que havia sido coletado em condições semelhantes por um único grupo de pesquisadores. Também incluiu acesso a informações clínicas e ao diagnóstico de cada soro determinado através de dois ensaios independentes, imunofluorescência indireta e ELISA. As conclusões desses estudos mostraram diferenças regionais significativas na morbidade da doença de Chagas com maior prevalência e gravidade das formas cardíacas e digestivas entre os pacientes de PI e MG que foram notavelmente menores entre os pacientes de AM e MS.^{16,18,19,20,23,24,25}

A escolha dos sete imunossaiários utilizados no presente estudo foi baseada na sua disponibilidade no mercado e na sua aprovação pela ANVISA, agência reguladora brasileira responsável. Além disso, esses mesmos kits foram utilizados em avaliação prévia utilizando os dois padrões internacionais de referência biológica da OMS para anticorpos *T. cruzi* que mostraram diferença de desempenho entre as origens dos soros utilizados para produzir os padrões.²⁵ Todo o Brasil foi representado no padrão de referência para o qual todos os testes comerciais apresentaram menor sensibilidade. Como o Brasil é um país geograficamente extenso e endêmico para diferentes cepas de *T. cruzi*, argumentamos que as diferenças

geográficas observadas com os padrões da OMS poderiam se estender às sub-regiões do país, representadas como os estados onde as amostras de pacientes foram coletadas.

A preocupação inicial era que o armazenamento das amostras biológicas pudesse ter levado à perda de títulos dos anticorpos. Os dados apresentados na Tabela II sugerem que esse não foi o caso, pois o percentual de amostras que permaneceram reagentes na maioria dos testes comerciais foi de 94,4%. Mais importante, a reatividade percentual pelo TESA Blot foi de 95,9%, o que é notável devido à sensibilidade normalmente menor deste ensaio em relação aos ELISAs, que foi o formato de seis dos sete kits comerciais. O outro formato foi um ensaio de quimioluminescência (CMIA).

O teste TESA é considerado um teste complementar para especificidade que consiste no fracionamento e separação de antígenos excretados e secretados em culturas de tripomastigotas cujos resultados são interpretados com base em uma avaliação visual.^{18,19,20} Aqui, a especificidade dos testes comerciais foi considerada boa com base na análise das amostras não reagentes. Todas as amostras de AM e MS inicialmente consideradas não reagentes permaneceram não reagentes e apenas uma de PI apresentou fraca reatividade pelos testes comerciais. Para as 28 amostras de MG, cinco não reagentes pelos testes iniciais foram reagentes nos testes comerciais. O percentual de amostras que corroboraram com o diagnóstico inicial não reagente, para os testes individuais em relação à região de origem das amostras biológicas, obteve boa

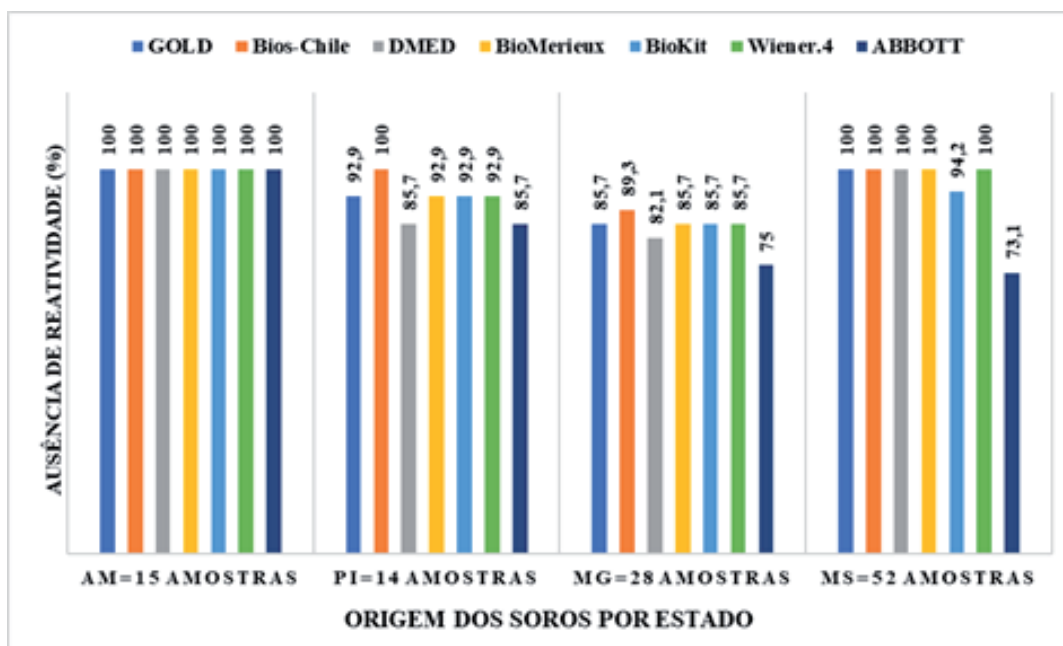


Figura 3: Percentual de resultados de cada teste comercial que não foram reagentes para anti-*T. cruzi* IgG para o diagnóstico inicial de acordo com o estado de origem brasileiro. O painel sorológico mostrou ser não reativo para anti-*T. cruzi* IgG, pelo protocolo de duas etapas e seus percentuais não-reagentes, para cada um dos kits comerciais analisados de cada estado de origem das amostras biológicas. MG - Minas Gerais; PI - Piauí; MS - Mato Grosso do Sul; AM - Amazonas.

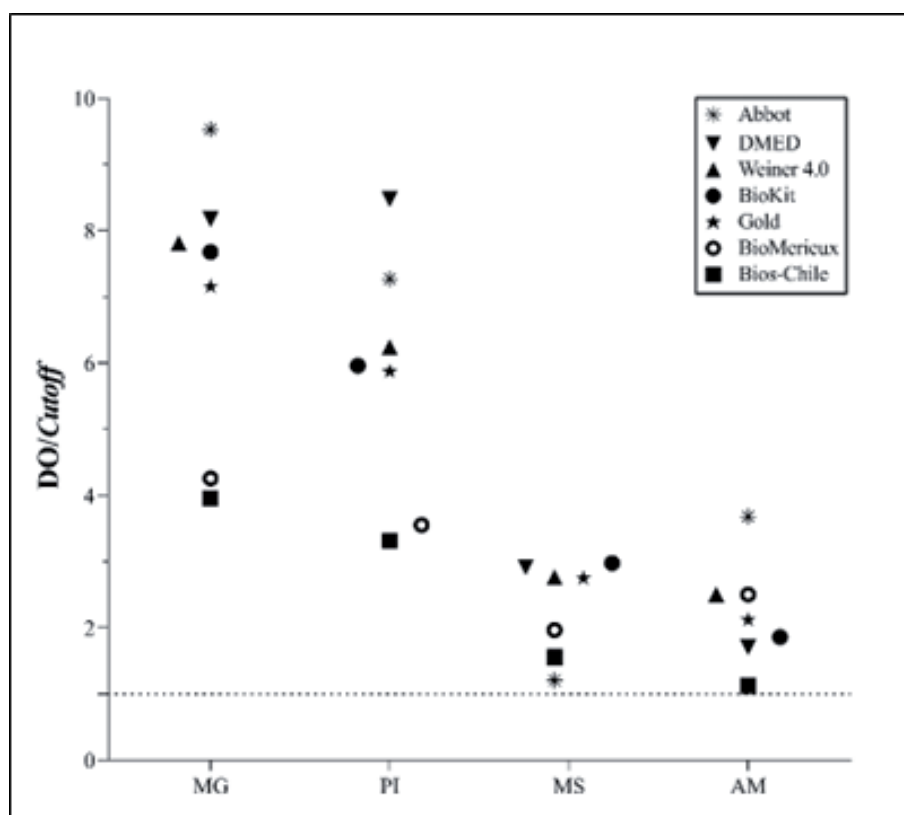


Figura 4: Índice de reatividade (DO/CO) medido a partir de cada teste para a detecção do anti-*T. cruzi* IgG de acordo com o estado de origem brasileiro. A média da densidade óptica obtida para cada kit em cada soro reagente, foi dividida pelo cutoff (ponto de corte) para gerar o IR, que foram plotados por cada região brasileira onde a amostra foi coletada. MG - Minas Gerais; PI - Piauí; MS - Mato Grosso do Sul; AM - Amazonas.

compatibilidade/coerência, com a exceção da CMIA que apresentou percentual menor.

O uso prático dos testes comerciais envolve o uso de uma dicotomia, reagente ou não reagente. É a partir do uso de dois ou mais testes que um resultado pode ser considerado divergente, reagente em um teste e não reagente em outro. Aqui, o número de amostras com resultados divergentes para reatividade entre o diagnóstico inicial e os kits comerciais variou em função do local geográfico da coleta. Todas as 64 amostras de MG que foram reagentes pelos testes iniciais também apresentaram reatividade nos kits comerciais, enquanto apenas duas das 43 amostras inicialmente reagentes de MS foram não reagentes. Nas amostras de PI, das 86 que foram reagentes para os dois testes iniciais, 82 mantiveram reativa nos kits comerciais. As amostras de Am mostraram a maior divergência. Das 41 reagentes pelos dois testes iniciais, apenas 26 permaneceram reagentes.

A divergência observada nas amostras de AM e MS foi mais evidente ao exibir os escores de positividade individual para cada teste comercial em Fig. 2. A principal faixa de concordância com o diagnóstico inicial das amostras am foi de 48,8% para 73,2, com um valor extremo de 95,1% (Wiener 4.0). Para as amostras de MS, a positividade variou dentro de uma faixa de 68,3% a 95,3%. Esses resultados sugeriram uma diferença na sensibilidade para detectar anticorpos *anti-T. cruzi* IgG relacionados à região geográfica do Brasil onde as amostras foram coletadas. Essa conclusão foi reforçada examinando o nível de reatividade, traçando a razão média de densidade óptica para o valor de corte de cada teste comercial ao estado de origem das amostras na Fig. 4. Cinco dos testes comerciais apresentaram níveis várias vezes superiores à razão de 1 para amostras coletadas em MG e PI, enquanto os níveis médios foram muito inferiores, embora reagentes, para MS e AM. Os outros dois testes comerciais mostraram a mesma tendência, mas não na mesma medida.

Há uma série de explicações possíveis para a aparente menor sensibilidade dos testes comerciais nas amostras dos estados de MS e AM. Estes incluem condições de coleta, como temperatura ambiente e umidade, erros de transporte, erros de processamento, erros de armazenamento que reduziram o título de anticorpos, falta de controles internos de qualidade e/ou variações no desempenho dos lotes do kit utilizados. As diferenças de sensibilidade poderiam refletir o desempenho dos componentes utilizados para capturar anticorpos *anti-T. cruzi* nos diferentes kits comerciais. Três dos formatos ELISA empregam

antígenos compostos por lisado total preparado a partir de parasitas cultivados em LIT, que seria a forma epimastigota do parasita. Outros três incorporam antígenos que consistem em proteínas recombinantes e um usa uma combinação de lisado com proteínas recombinantes. Outra possibilidade são diferenças na resposta imune do paciente relacionadas à genética da demografia, a cepa de *T. cruzi* responsável pela infecção ou uma combinação dos dois.

É interessante notar que o comportamento dos imunoenzatos, no que diz respeito à reatividade ou à não reatividade, foi homogêneo em praticamente todas as amostras analisadas, sem discrepâncias entre elas. No entanto, o maior impetu para a realização dessas avaliações persiste: a ausência de um ensaio imunológico padrão-ouro para o diagnóstico de uma infecção por *T. cruzi*. Isso se reflete no número de diagnósticos indeterminados dos testes iniciais. Das 30 amostras inicialmente reagentes apenas no teste IFI, 25 não eram reagentes e cinco reagentes pelos testes comerciais. As seis amostras que apresentaram resultado não reagente no teste inicial de IFI e um resultado reagente no teste ELISA, todas apresentaram resultados não reagentes pelos testes comerciais. Deve-se notar que o teste IFI, devido às suas características com uso de reagentes de diversas fontes e leitura visual, tem sido considerado uma fonte de resultados falsos positivos em diversos estudos de triagem.^{15,16} Outros falsos positivos podem ocorrer a partir da reatividade cruzada, em especial com *Leishmania*.²⁷ Embora as amostras aqui analisadas não tenham sido testadas para anticorpos contra *leishmania*, a consistência entre os resultados de ensaios que utilizam alvos diferentes sugere pouca reatividade cruzada.

Em última análise, a diferença de sensibilidade detectada entre os testes comerciais relacionados à origem geográfica das amostras biológicas pode ser considerada uma medida de robustez regional do teste. Todos os testes apresentaram uma robustez limitada/limitação na robustez para as amostras sorológicas provenientes do AM e MS, que poderia ter sido prejudicada ainda mais por alguma ou todas as circunstâncias atenuantes que cercaram a coleta de cada amostra biológica. Produtores e órgãos regulamentadores devem ser encorajados a avaliar o desempenho de novos kits indo além do patógeno para incluir painéis de soros que possam abranger possíveis influências regionais no desempenho.

AGRADECIMENTOS

Para José de Souza Nogueira e Júlio César Miguel, técnicos da LDP/COI/FIOCRUZ por sua participação no trabalho de campo e laboratório no momento da coleta.

REFERÊNCIAS

1. OMS - Organização Mundial da Saúde. Doença de Chagas na América Latina: uma atualização epidemiológica com base nas estimativas de 2010. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015; 90(6): 33-43. [Links]
2. Montoya R, Dias JC, Doença de Coura JR. Chagas em uma comunidade do sudeste do Brasil. I. Um estudo de acompanhamento sorológico em uma área controlada por vetores. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2003; 45(5): 269-74. [Links]
3. OMS - Organização Mundial da Saúde. Integração de doenças tropicais negligenciadas à saúde e ao desenvolvimento globais. Quarto relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas. QUEM. 2017. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241565448/en/. [Links]
4. OMS - Organização Mundial da Saúde. Controle da doença de Chagas. Segundo relatório do Comitê de Especialistas da OMS. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2002.]
5. OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Chagas nas Américas para trabalhadores públicos da saúde. Washington. 2014. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743. [Links]
6. OMS - Organização Mundial da Saúde. Doença de Chagas. Eliminação da transmissão, Uruguai. *Wkly Epidemiol Rec.* 1994; 59: 38-40. [Links]
7. OMS - Organização Mundial da Saúde. Doença de Chagas. Interrupção da transmissão, Chile. *Wkly Epidemiol Rec.* 1995; 70: 13-6. [Links]
8. Dias JCP. Iniciativa do Cone Sul para a eliminação das populações domésticas de infestanos de *Triatoma* e a interrupção da doença transfusional de Chagas. Aspectos históricos, situação presente e perspectivas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102(Suppl. 1): 11-8. [Links]
9. Cucunubá ZM, Manne-Goehler JM, Díaz D, Nouvellet P, Bernal O, Marchiol A, et al. Quão universal é a cobertura e o acesso ao diagnóstico e tratamento da doença de Chagas na Colômbia? Uma análise de sistemas de saúde. *Soc Sci Med.* 2017; 175: 187-98. [Links]
10. Manne-Goehler JM, Reich MR, Wirtz VJ. Acesso ao cuidado da doença de Chagas nos Estados Unidos: uma análise de sistemas de saúde. *Sou J Trop Med Hyg.* 2015; 93(1): 108-13. [Links]
11. Manne JM, Snively CS, Ramsey JM, Salgado MO, Bärnighausen T, Reich MR. Barreiras ao tratamento da doença de Chagas no México. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(10): e2488. [Links]
12. Sáez-Alquézar A, Luquetti AO, Borges-Pereira J, Moreira EF, Gadelha MFS. Estudo multicêntrico: avaliação de desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponível no Brasil, para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Patol Trop.* 1997; 26(2): 343-74. [Links]
13. Saéz-Alquezar A, Junqueira ACV, Durans AM, Guimarães AV, Corrêa JA, Provance Jr DW, et al. Aplicação de Normas Internacionais de Referência Biológica da OMS para avaliação de testes sorológicos comerciais para doença crônica de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020; 115: e200214. [Links]
14. Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, Nieto J, Leiby DA, Paris L, et al. Avaliação comparativa de 11 testes diagnósticos rápidos comercializados para detecção de anticorpos *Trypanosoma cruzi* em bancos de soro em áreas de endemicidade e não desammicidade. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(7): 2506-12. [Links]
15. Saéz-Alquézar A, Otani MM, Sabino EC, Ribeiro-dos-Santos G, Salles N, Chamone DF. *Vox Sang.* 1998; 74(4): 228-31. [Links]
16. Salles NAEC, Sabino MG, Cliquet J, Eluf-Neto A, Mayer C, Almeida-Neto C, et al. Exposição de risco para a doença de Chagas entre doadores de sangue brasileiros seroretivos. *Transfusão.* 1996; 36(11-12): 969-73. [Links]

17. Junqueira ACV, Gonçalves TCM, Moreira CJC. Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopistas de malária e laboratoristas da rede pública. 2ª ed. SCV/ICICT. [Links]
 18. Borges-Pereira J, Xavier SS, Pirmez C, Doença de Coura JR. Chagas no Município de Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brasil. IV. Aspectos clínicos e epidemiológicos do aneurisma ventrículo esquerdo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31(5): 457-63. [Links]
 19. Borges-Pereira J, Castro JAF, Campo 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): 315-22. [Links]
 20. Borges-Pereira J, Zauza PL, Galhardo MC, Nogueira JS, Pereira GROL, Cunha RV. Chagas na população urbana do distrito sanitário de Rio Verde, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34: 459-66. [Links]
 21. MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(Suppl. 3): 29 pp. [Links]
 22. Daniel WW. Bioestatística - Conceitos básicos e metodologia para as ciências da saúde. 9ª ed. Cingapura: John Wiley & Sons (Ásia) Pte Ltd; 2010. p. 334-68. [Links]
 23. Coura JR, Abreu LL, Dubois LEG, Correia-Lima F, Arruda Jr E, Willcox HPF, et al. Morbidade da doença de Chagas. II - Estudos seccionais em quatro áreas de campo no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984; 79(1): 101-24. [Links]
 24. Coura JR, doença borges-Pereira J. Chagas: O que se sabe e o que deve ser melhorado: uma revisão sistêmica. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45: 286-96. [Links]
 25. Brum-Soares LM, Xavier SS, Sousa AS, Borges-Pereira J, Barbosa-Ferreira JMB, Costa IR, et al. Morbidade da doença de Chagas em pacientes autóctones da microrregião do Rio Negro, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; 43: 170-7. [Links]
 26. OMS - Organização Mundial da Saúde, Comitê Especializado em Padronização Biológica da OMS, Otani MAP, Hockley J, Guzmán CB, Rijpkema SJ, et al. Avaliação de dois padrões internacionais de referência para anticorpos para *Trypanosoma cruzi* em estudo colaborativo da OMS. 2011. Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/152895>. [Links]
 27. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Avaliação de testes sorológicos para identificar a infecção por *Trypanosoma cruzi* em humanos e determinar a reatividade cruzada com *Trypanosoma rangeli* e *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14(8): 1045-9. [Links]
- Apoio financeiro: OMS, Programa Nacional de Controle de Qualidade.
- Recebido: 01 de fevereiro de 2021; Aceito: 04 de maio de 2021.
- + Autor correspondente: amadeo62@gmail.com
- † In memoriam
- ASA e PAV e JRC - Concebeu o estudo e projetou os experimentos; AVG, PAV e ASA - metodologia; PC - análise estatística; ASA, AMD e DWP - redação e edição; ACVJC, JAC, AMD, JBP, PLZ e DWP - revisou criticamente o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final. Os autores declaram que não têm conflito de interesses.