

Márcia Maria Ferreira da Silva

**SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS TESTES SOROLÓGICOS PARA
DOENÇA DE CHAGAS USADOS NA TRIAGEM SOROLÓGICA
DE DOADORES DE SANGUE**

**Uberaba - MG
Novembro, 2006**

Márcia Maria Ferreira da Silva

**SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS TESTES SOROLÓGICOS PARA
DOENÇA DE CHAGAS USADOS NA TRIAGEM SOROLÓGICA
DE DOADORES DE SANGUE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, área de concentração: Patologia Clínica, como requisito parcial à obtenção do Título de

Orientador: Helio Moraes de Souza
Co-orientador: Luiz Eduardo Ramírez

Uberaba - MG
Novembro, 2006

Apoio Financeiro:

- UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro
- FUNDAÇÃO HEMOMINAS
- FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Local de desenvolvimento do trabalho:

- Hemocentro Regional de Uberaba / FUNDAÇÃO HEMOMINAS
- Serviço de Patologia Clínica do Hospital Escola da UFTM – Laboratório Central (Setor de Sorologia)
- Laboratório de Parasitologia Humana da UFTM

Agradecimentos

À Deus, pela determinação e por mais esta conquista.

Aos meus pais e irmãos, pelo estímulo, carinho e apoio incondicional.

Ao professor Dr. Helio Moraes de Souza, exemplo de competência e dedicação, pela oportunidade e ensinamentos.

Aos funcionários do Hemocentro Regional de Uberaba pela colaboração e esclarecimentos prestados em todas as etapas deste trabalho.

Aos professores: Dr. Luiz Eduardo Ramirez e Dra. Eliane Lages Silva, pelo espaço cedido nos laboratórios de Parasitologia Humana da UFTM, pela atenção e contribuições imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório Central do Hospital Escola e da Disciplina de Parasitologia da UFTM pela colaboração e desempenho demonstrados.

Ao prof. Gilberto Araújo Pereira, pelo auxílio indispensável na análise estatística dos dados.

Ao diretor do Hemocentro Regional de Uberaba, Dr. Paulo Roberto Juliano Martins, pelo incentivo e por acolher nossa idéia, permitindo a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do mestrado com quem compartilhamos nossas dúvidas, alegrias e conhecimentos.

À todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Patologia da UFTM que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão desta importante etapa.

À UFTM e à FUNDAÇÃO HEMOMINAS pelo apoio e incentivo à pesquisa científica.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas – aspectos gerais	5
1.2. Doença de Chagas e transfusão de sangue	13
2. HIPÓTESE	18
3. OBJETIVOS	19
1. Objetivo Geral	19
2. Objetivos Específicos	19
4. METODOLOGIA	20
4.1. Material	20
4.2. Casuística.....	20
4.3. Procedimentos	23
4.4. Análise estatística	35
5. RESULTADOS	40
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES	77

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
--	-----------

9. ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1) Distribuição geográfica da doença de Chagas no Brasil entre 1983 e 1995	6
Figura 2) Algoritmo utilizado na triagem sorológica para doença de Chagas FUNDAÇÃO HEMOMINAS, julho / 2000	27
Figura 3) Algoritmo utilizado na triagem sorológica para doença de Chagas na FUNDAÇÃO HEMOMINAS / 2004	30
Figura 4) Critérios de exclusão para a convocação dos 269 doadores não-negativos para doença de Chagas	29
Figura 5) Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas atendidos no HRU no período de 2000 a 2005	40
Figura 6) Distribuição dos doadores com sorologia positiva para doença de Chagas em cinco faixas etárias.....	43
Figura 7) Distribuição dos doadores com sorologia indeterminada para doença de Chagas em cinco faixas	43
Figura 8) Distribuição dos doadores positivos para doença de Chagas quanto ao ano	44
Figura 9) Distribuição dos doadores indeterminados para doença de Chagas quanto ao ano	44
Figura 10) Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas quanto ao tipo de doador	45
Figura 11) Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas quanto à cor	46

Figura 12) Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas quanto ao Sexo	46
Figura 13) Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas quanto à idade	47
Figura 14) Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas quanto à procedência	48
Figura 15) Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas quanto à profissão	48
Figura 16) Distribuição dos doadores com sorologia positiva (A), negativa (B) e indeterminada (C) quanto à cor	55
Figura 17) Distribuição dos doadores com sorologia positiva (A), negativa (B) e indeterminada (C) quanto ao sexo	56
Figura 18) Distribuição dos doadores com sorologia positiva (A), negativa (B) e indeterminada (C) quanto à idade	57
Figura 19) Distribuição dos doadores com sorologia positiva (A), negativa (B) e indeterminada (C) quanto à procedência	58
Figura 20) Resultado da hemocultura entre os não-negativos para doença de Chagas.....	62
Figura 21) Resultado da repetição sorológica e do teste parasitológico dos 30 doadores indeterminados no HRU segundo sorologia do Laboratório de Patologia Clínica – Hospital Escola	63
Figura 22) Análise geral dos resultados dos 90 doadores convocados	63
Figura 23) Análise do <i>cut off</i> (teste de ELISA) dos 90 doadores convocados	65

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1)** Tabela de dupla entrada para o cálculo de sensibilidade e especificidade34
- Tabela 2)** Tabela de dupla entrada para cálculo do índice *kappa*
37
- Tabela 3)** Tabela de dupla entrada para o cálculo do risco relativo (RR) 38
- Tabela 4-** Ocorrência de inaptidão sorológica para doença de Chagas entre doadores novos e de retorno do HRU no período de 2000 a 2005
41
- Tabela 5** – Distribuição dos doadores do HRU aptos e inaptos sorológicos para doença de Chagas, quanto ao gênero, no período de 2000 a 2005
41
- Tabela 6** – Distribuição dos doadores do HRU aptos e inaptos sorológicos para doença de Chagas, quanto à idade, no Período de 2000 a 2005
42
- Tabela 7)** Proporção de cada teste utilizado na triagem sorológica para doença de Chagas entre doadores não-negativos para doença de Chagas no período de 2000 a 2005 49
- Tabela 8)** Tipos de testes utilizados na triagem sorológica dos doadores não - negativos para doença de Chagas no período de 2000 a 2005
49
- Tabela 9)** Tabela de dupla entrada utilizada para cálculo da concordância entre os testes

de ELISA e IFI	50
Tabela 10) Tabela de dupla entrada utilizada para cálculo da concordância entre os testes de ELISA e HAI	50
Tabela 11) Tabela de dupla entrada utilizada para cálculo da concordância entre os testes de IFI e HAI	50
Tabela 12) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade da HAI .	51
Tabela 13) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade da IFI	51
Tabela 14) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade do ELISA	52
Tabela 15) Distribuição dos 140 candidatos à doação com sorologia indeterminada para doença de Chagas quanto aos resultados de cada teste	52
Tabela 16) Características sócio-demográficas dos 90 doadores convocados	54
Tabela 17) Ocorrência de antecedentes para doença de Chagas entre os 90 doadores convocados	59
Tabela 18) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade do teste se ELISA	60
Tabela 19) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade da IFI ..	60
Tabela 20) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade da HAI .	61
Tabela 21) Descrição dos valores de <i>Cut off</i> do teste de ELISA para os três grupos de doadores	64

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- EDTA– ácido etilenodiaminotetracético

- ELISA – Enzyme linked immunossorbent assay
- FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais
- FNS – Fundação Nacional de Saúde
- HAI – Hemaglutinação Indireta
- HE / UFTM – Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
- HEMOCE – Hemocentro do estado do Ceará
- HEMOPA – Hemocentro do estado do Pará
- HEMOSC – Hemocentro do estado de santa Catarina
- HRU – Hemocentro Regional de Uberaba
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IFI – Imunofluorescência Indireta
- LIT – Liver infusion tryptose
- mL – mililitro
- OPAS – Organização Pan Americana de Saúde
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- SUS – Sistema Único de Saúde
- *T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi*
- TESA- blot – Trypomastigote excreted-secreted antigen
- UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

RESUMO

Justificativa e objetivos: Atualmente, um dos maiores problemas na triagem sorológica de doadores de sangue para doença de Chagas é a ocorrência de reações indeterminadas, o que faz com que muitos indivíduos sadios sejam rotulados como portadores de uma doença grave. O presente trabalho tem o objetivo de analisar o perfil sorológico para doença de Chagas dos doadores do Hemocentro Regional de Uberaba (HRU) e avaliar a sensibilidade e a especificidade dos testes empregados.

Casuística e Métodos: O trabalho foi realizado a partir da análise dos históricos dos doadores que compareceram ao HRU entre 2000 e 2005, dos quais foram coletados dados

sócio-demográficos. Das 95.990 doações realizadas neste serviço, 269 apresentaram sorologia não-negativa para doença de Chagas. Destes, foram convocados 30 doadores positivos e 30 indeterminados para a repetição de testes sorológicos (ELISA, HAI e IFI), realização de um teste parasitológico e avaliação epidemiológica. Foi analisado ainda, um grupo de doadores do HRU negativos para a doença de Chagas (grupo controle). A análise estatística foi feita através de estatística descritiva, dos testes de comparação de proporções (Z) e do Qui-quadrado (X^2), cálculos dos coeficientes de sensibilidade e especificidade e do índice *Kappa* para a análise de concordâncias entre os testes.

Resultados: A ocorrência de doadores não-negativos para doença de Chagas, no Hemocentro Regional de Uberaba foi de 0,28% nos últimos seis anos. Quanto às características sócio-demográficas, no grupo dos positivos houve predomínio de doadores novos (99%), brancos (66%), com idade superior a 30 anos (81%), procedentes de regiões endêmicas (96%) e exercendo profissões semi-qualificadas (43%). Observou-se que entre os 30 doadores com sorologia indeterminada, 28 (93%) apresentaram-se negativos nos quatro testes realizados, um foi positivo no teste de ELISA e o outro permaneceu indeterminado pela técnica de HAI. O conjunto de testes que apresentou melhor concordância foi ELISA x HAI (*Kappa*= 0,66). A repetição das técnicas sorológicas revelou 100% de sensibilidade para os três testes sorológicos e especificidade de 96,6% para o ELISA e 100% para HAI e IFI.

Conclusão: A ocorrência de reações sorológicas indeterminadas entre doadores de sangue, ainda que relativamente baixa, como mostra nosso estudo, reforça a necessidade de persistirmos na busca por métodos laboratoriais alternativos, de baixo custo e alta reprodutibilidade, que tenham sensibilidade e especificidade de 100% e que possam ser utilizados em associação com testes sorológicos, visando compensar as possíveis falhas destes testes. Isto protegeria o receptor de uma transfusão de sangue chagásico e eliminaria as reações falso-positivas, evitando assim o desperdício de bolsas de sangue e a exclusão de doadores falsamente inaptos.

Palavras-chave: doença de Chagas transfusional; reações sorológicas indeterminadas; sensibilidade e especificidade de testes sorológicos.

ABSTRACT

Justification and purpose: Currently, one of the biggest problems in the serological screening of blood donors in respect to Chagas' disease is the occurrence of indeterminate reactions, what makes to many healthy individuals as owners of a serious illness. This paper aims to evaluate the serological profile of Chagas' disease of donors at Uberaba Blood Center and the sensitivity and the specificity of the employed tests.

Casuistry and Methods: The work was carried out through the analysis of descriptions of blood donors that had appeared in the Uberaba Blood Center between the years 2000 to 2005, of which were collected partner-demographic data. Of the 95,990 donations carried through in this period, 269 had presented not negative serology for Chagas' disease. Of these, 30 positive and 30 indeterminate blood donors were convoked for the repetition of serological tests (ELISA, HAI and IFI), accomplished of a parasitological test and an epidemiologic evaluation. It was also analyzed a group of negative donors concerning Chagas' disease (control group). The statistics analysis was made through descriptive statistics, tests of comparison of proportions (z) and chi-square (X^2), calculations of the coefficients of sensitivity and specificity and Kappa index for the analysis of agreement among the tests.

Results: The occurrence of not negative donors for Chagas' disease at Uberaba Blood Center it was of 0,28% in the last six years. Concerning the partner-demographic characteristics, in the group of the positives there was predominance of first-time donors (99%), whites (66%), over 30-year-old (81%), originary at endemic regions (96%) and carrying out low-qualified professions (43%). It was observed that among the 30 donors with undetermined serology, 28 (93%) presented negative results in the four tests carried out, one was positive in the ELISA test and the other remained indeterminate for the HAI technique. The set of tests that presented the best agreement was ELISA x HAI (Kappa= 0,66).The repetition of the serological techniques disclosed 100% of sensitivity for the three serological tests and specificity of 96,6% for ELISA and 100% for HAI and IFI.

Conclusion: The occurrence of undetermined serological reactions among blood donors, despite relatively low as it shows our study, strengthens the necessity to persist in the search for alternative laboratorial methods, of low cost and high reproducibility, with sensitivity and specificity of 100% and that can be used in association with serological tests, aiming to compensate the possible imperfections of these tests. This would protect the receiver of the transfusion of chagasic blood and would eliminate the false-positive reactions, thus preventing the wastefulness of blood bags and the exclusion of falsely inapt donors.

Key-words: transfusional Chagas' disease; indeterminate serological reactions; sensitivity and specificity of serological test.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas continua sendo uma grave endemia que acomete de 13 a 15 milhões de latino-americanos. A maioria dos infectados se origina de áreas rurais e, devido a políticas sócio-urbanizadoras, cerca de 60% destes indivíduos migraram para os centros urbanos nas últimas décadas (DIAS, 1987; DIAS et al., 2002). Como aproximadamente a metade dos infectados permanece assintomática, mais de quatro milhões de chagásicos são potenciais doadores de sangue e, portanto passíveis de disseminar esta grave doença (MORAES-SOUZA & BORDIN, 1996).

Desde década de 80, quando os programas de controle do vetor tornaram-se efetivos e com ampla cobertura, a transmissão vetorial da doença de Chagas vem perdendo sua importância, diminuindo gradativamente os casos agudos no país (WENDEL, 1992).

O eficiente trabalho de combate aos triatomíneos, que culminou com a eliminação do *Triatoma infestans*, seu principal vetor, bem como a migração rural-urbana ocorrida na América Latina, vêm colocando em evidência mecanismos secundários de transmissão da doença de Chagas, entre eles: a transmissão acidental em laboratórios, a congênita, a por transplante de órgãos e a transfusional, responsáveis pela manutenção da doença nos dias atuais (MORAES-SOUZA, 1993; SCHMUNIS, 1997).

Vários estudos mostram uma grande variação na prevalência de candidatos a doadores de sangue com sorologia positiva para o *Trypanosoma cruzi*. A América Latina, que na década de 80 apresentava uma prevalência média de 6,8%, influenciada pelos altos índices apresentados pela Bolívia (62,5%), reduziu para 2,63% no final da década de noventa (OPAS, 2003). No Brasil, segundo dado da ANVISA (2002), o índice de descarte de bolsas de sangue por sorologia positiva para *T. cruzi* é de 0,6%. Queda altamente significativa se contrastada

com o índice de 7,0% dos anos setenta (MORAES-SOUZA & BORDIN,1996; MORAES-SOUZA, 2000).

Em Uberaba, no final dos anos sessenta, apenas a doença de Chagas excluía 16,6% dos doadores de sangue, índice hoje reduzido a 0,28% graças à erradicação sistemática do vetor e aos programas de fidelização de doadores, que hoje respondem por 82% das doações anuais de sangue (MORAES-SOUZA, et al., 2006).

A possibilidade de infecção pela transfusão de sangue depende de vários fatores, como a presença de parasitemia no momento da doação, volume de sangue transfundido, estado imunológico do receptor, prevalência da infecção pelo *Trypanossoma cruzi* entre os candidatos a doadores de sangue e das medidas de controle do sangue a ser transfundido (WENDEL et al., 1997).

A real incidência da infecção pelo *T. cruzi* adquirida pela transfusão sangüínea é desconhecida, uma vez que a maioria dos casos permanece assintomática ou a doença se manifesta anos e até décadas mais tarde. O risco do receptor contaminar-se ao receber uma única unidade infectada de sangue é de 13% a 48%, risco que aumenta nos pacientes politransfundidos e/ou quando o doador é proveniente de região de transmissão ativa da infecção (SCHMUNIS, 1991; MORAES-SOUZA et al.,2000).

No Brasil, o problema da doença de Chagas transfusional vem se tornando menos grave devido à redução da sua prevalência entre os doadores (conseqüência da erradicação do principal vetor, o *Triatoma infestans*) e à alta cobertura sorológica, resultantes da interiorização e melhor qualificação da hemorede pública e ainda, graças à atuação mais efetiva

da vigilância sanitária sobre os serviços de hemoterapia públicos e privados (MONCAYO, 2003).

Anualmente, são realizadas cerca de 2,8 milhões de doações no país. Em relação à infecção pelo *T. cruzi*, estima-se que 16.800 unidades (0,6%) colhidas são classificadas como não negativas. Considera-se que destas, 3.400 (20%) são confirmadas como positivas e 13.400 (80%) apresentam resultados indeterminados. Estes últimos, possivelmente de indivíduos não portadores de infecção chagásica e, portanto, caracterizando falha na especificidade dos testes empregados. Observa-se também, ainda que raramente, a ocorrência de reações positivas em doadores de “repetição” que, obviamente, em reações anteriores apresentaram-se negativas. Tais casos podem caracterizar falha humana, ou na sensibilidade das técnicas disponíveis (SALLES et al., 1996; MORAES-SOUZA, 2000).

Considerando que os testes disponíveis no mercado para detecção de *Trypanossoma cruzi* possuem sensibilidade média de 99%, demonstrada em vários estudos (MORAES-SOUZA, 2000; LANGHI JÚNIOR et al., 2002), prevê-se que das 2,8 milhões de unidades coletadas, 40 sejam falsamente classificadas como negativas, indicando que anualmente há um risco de que 80 unidades infectadas sejam transfundidas, se considerarmos o índice de fracionamento do sangue igual a dois (XVI REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA EM DOENÇA DE CHAGAS).

Fixando-se em 20% o risco médio de transmissão da infecção chagásica para cada unidade contaminada transfundida, o índice médio de aproveitamento dos hemocomponentes de 1,2 (ANVISA, 2002) e, considerando a estimativa de que menos da metade dos pacientes transfundidos sobrevivem à doença de base, pode-se prever que atualmente, menos de três

peças a cada ano desenvolvem doença de Chagas transfusional no Brasil (MORAES-SOUZA – comunicação pessoal), cenário bastante diferente daquele dos anos setenta quando se estimou em 10.000 a 20.000 o número de contaminações anuais (DIAS, 1987).

Diante deste cenário, o problema que se apresenta mais preocupante em bancos de sangue, é o real significado do grande número de reações indeterminadas e as consequências que estas trazem ao doador rotulado como portador de uma doença grave e altamente estigmatizante.

1.1- Doença de Chagas – aspectos Gerais

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é causada por um protozoário flagelado, o *Trypanosoma cruzi*, sendo transmitida ao homem e a outros animais, principalmente através de vetores invertebrados, os triatomíneos (BRENER, 1997). Foi identificada em 1909 por Carlos Chagas, enquanto estava realizando um trabalho sobre a malária na cidade de Lassance no interior de Minas Gerais. Após a constatação da doença em humanos, Chagas passou a investigar incansavelmente esta nova parasitose, descrevendo assim o agente, o vetor, a epidemiologia e suas manifestações clínicas (CHAGAS, 1909).

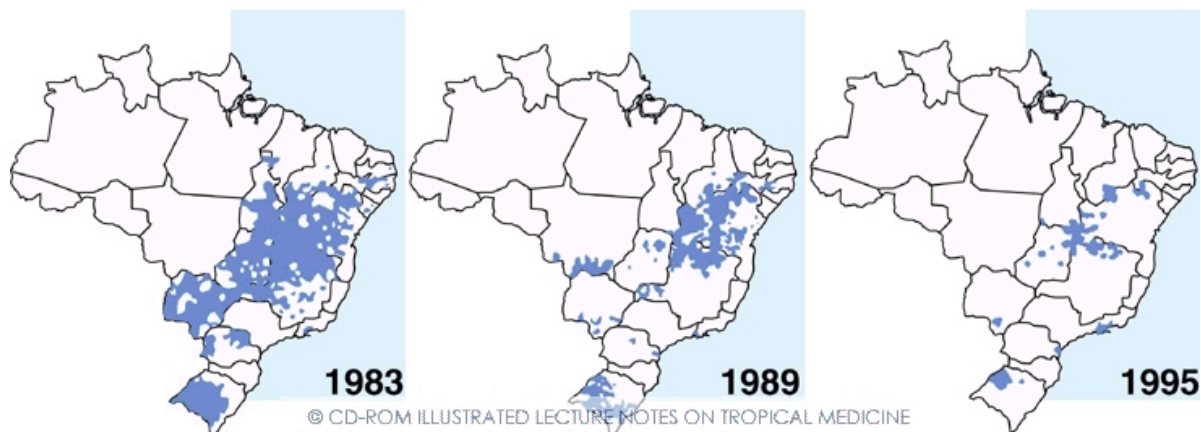
A princípio, uma enzootia silvestre, a doença de Chagas espalhou-se entre as populações rurais. O ciclo de maior importância epidemiológica é o doméstico, já que perpetua a infecção em seres humanos (SCHMUNIS et al., 2000). Este ciclo resulta do contato entre o homem e o vetor, envolvendo a colonização de ecótopos artificiais pelos triatomíneos. Normalmente, essa colonização é resultante de modificações sociais e ecológicas no meio ambiente provocadas pelo homem. No ciclo doméstico, o parasitismo pode causar importantes danos aos hospedeiros vertebrados, com alto grau de morbidade e mortalidade nos infectados (DIAS, 1992). O vetor pode se adaptar às moradias humanas, crescendo e multiplicando-se em fendas de paredes, buracos do telhado, debaixo e atrás dos móveis e outros pontos das residências com paredes de barro ou tijolo cru, de palha ou junco. Os principais reservatórios

do parasita são os seres humanos, cães, gatos e em alguns países as cobaias (SCHMUNIS et al., 2000).

No Brasil, as espécies de vetores da doença de Chagas que assumiram maior importância em saúde pública, devido à sua capacidade de domiciliação, foram o *Triatoma infestans* - atualmente eliminado na maioria das regiões (OPAS, 2006) , *Panstrongylus megistus* (Nordeste, Sudeste e Sul) e *Triatoma sordida* (Bahia, Centro-oeste) (SILVEIRA, 1984; DIAS, 1994).

A maior parte dos casos de infecção humana é transmitida naturalmente pelo vetor. Ocorre pelo contato da pele ou mucosas, feridas pelo triatomíneo durante o repasto sangüíneo, com fezes ou urina do inseto hematófago que contêm a forma infectante do *Trypanosoma cruzi* – tripomastigota metacíclico. (FREITAS, 1975; CORREA e MIRANDA FILHO, 1995). Este mecanismo de transmissão vem perdendo sua importância epidemiológica devido aos trabalhos efetivos de combate aos triatomíneos na maioria dos países latino-americanos. No Brasil, dos treze Estados considerados endêmicos para doença de Chagas na década de 70, seis apresentavam focos do *Triatoma infestans* até 1995 (**figura 1**) e em 2002 apenas quatro permaneciam com focos isolados do vetor (MONCAYO, 2003). Em junho de 2006 o país foi certificado pela Organização Pan Americana de Saúde como livre da transmissão vetorial (OPAS, 2006).

Areas infested by *Triatoma infestans*, Brasil;1983,1989 and 1995



Fonte: Instituto de Medicina Tropical, 1997.

Figura 1) Distribuição geográfica da doença de Chagas no Brasil entre 1983 e 1995.

Uma evidência da interrupção da transmissão vetorial foi obtida com a realização de um novo inquérito nacional de soroprevalência, dirigido a crianças com faixa etária entre 0 e 5 anos. Do total de 90 mil amostras processadas originadas de diferentes áreas, apenas oito casos foram confirmados. Apesar de não se poder afastar totalmente a ocorrência de transmissão vetorial, a mesma seria esporádica (OPAS, 2006) e, possivelmente estas crianças podem ter sido infectadas por transmissão vertical (mãe-filho).

Outras vias de transmissão incluem: transfusões de sangue ou transplantes de órgãos de doadores infectados, transmissão congênita de mães infectadas, ingestão de substâncias infectadas e as infecções acidentais em pessoas que trabalham em laboratórios (MORAES-SOUZA, 1993; SCHMUNIS, 1997). A infecção transfusional apresentava-se, até

na década de 80, como um dos fatores mais importantes no surgimento de novos casos da doença de Chagas no Brasil, principalmente nos grandes centros urbanos, como consequência do grande contingente de imigrantes rurais e a ineficiente seleção de doadores nos bancos de sangue (DIAS, 1987). Entretanto, devido ao extenso programa de controle dos bancos de sangue em toda a América Latina, que passaram a realizar a triagem sorológica para doença de Chagas em todos os doadores, os casos de transmissão transfusional diminuíram drasticamente (OPAS, 2006).

É importante ressaltar que, além dos malefícios individuais, a doença de Chagas apresenta-se como uma importante doença de contexto social, uma vez que esta constitui uma enfermidade crônica debilitante e incapacitante. Na América Latina, a doença de Chagas produziu o maior ônus de enfermidade entre as denominadas doenças tropicais. O ônus que produz a doença de Chagas é o quarto em importância entre as enfermidades infecciosas prevalentes na região. Somente as infecções respiratórias agudas, as doenças diarréicas e a AIDS produzem um ônus maior (SCHMUNIS, 2000).

Inicialmente, a doença é caracterizada por uma forma aguda, geralmente assintomática, caracterizada principalmente por alta parasitemia. O sintoma mais importante nesta fase é a porta de entrada do parasita, que pode ser evidenciada pelo inchaço unilateral de ambas as pálpebras, descrito como sinal de Romanã. Outra possibilidade da pesquisa clínica é encontrar as possíveis portas de entrada em diversas regiões da pele, conhecidas como Chagoma de inoculação (KIRCHOFF, 1993).

A parasitemia durante a fase aguda da doença é relativamente alta e a taxa de mortalidade nesta fase pode alcançar 10 a 15% em certas regiões, o que parece estar relacionado com a cepa do parasita em particular (SCHOFIELD, 1991).

A fase crônica da doença de Chagas compreende todos os pacientes depois dos primeiros 60 dias da infecção aguda, onde se observa parasitemia sub-patente (KIRCHOFF, 1993). Esta pode ser subdividida em três formas clínicas principais: indeterminada, cardíaca e digestiva, podendo ainda existir a forma cárdio-digestiva.

A forma indeterminada ou assintomática é observada em 60 a 70% dos pacientes na fase crônica. Do ponto de vista clínico, não há envolvimento cardíaco ou digestivo. Pacientes com esta forma têm prognósticos melhores do que os pacientes sintomáticos, entretanto, 2% a 5% destes pacientes convertem, anualmente, às formas cardíacas e/ou digestivas, por razões ainda não esclarecidas (HIGUCHI, 1999; UMEZAWA et al., 2001).

A maior causa de morbidade e mortalidade na doença de Chagas e daí a sua importância, são as alterações cardíacas e gastrointestinais, provenientes de um processo inflamatório crônico fibrosante da musculatura cardíaca ou digestiva e ainda da denervação motora destes órgãos (CHAPADEIRO, 1999).

A forma cardíaca compreende cerca de 30 a 40% dos casos crônicos. Os pacientes podem apresentar arritmia, falência cardíaca ou tromboembolismo. Na cardiomiopatia chagásica, que caracteriza a forma crônica cardíaca da doença, o coração encontra-se muitas vezes dilatado e hipertrofiado, havendo aneurisma apical e uma miocardite progressiva e fibrosante, decorrente do processo inflamatório (HIGUCHI, 1999). A forma digestiva é usualmente manifestada como megaesôfago e/ou megacólon e ocorre em cerca de 10% dos

casos, dependendo da região geográfica do estudo (UMEZAWA et al., 2001). O cólon de pacientes chagásicos com acometimentos gastrointestinais está frequentemente comprometido, podendo haver dilatação do órgão. Pacientes sintomáticos podem ter disfunção de motilidade e obstipação intestinal. Além do cólon, também pode haver comprometimento esofageano, sendo este bastante comum e caracterizado por disfagia e regurgitação (FIGUEIREDO et al., 2002).

Apesar dos índices de mortalidade estarem sofrendo progressiva queda, a ocorrência de aproximadamente cinco mil óbitos de chagásicos no país, por ano, ainda representa a primeira causa de morte entre as doenças parasitárias, o que requer atenção especial aos 3,5 milhões de brasileiros acometidos pela doença. Apesar dos tratamentos disponíveis serem mais eficazes na fase aguda, o acompanhamento clínico específico e periódico pode minimizar os efeitos da cronicidade da doença, diminuindo a incapacitação e melhorando a qualidade de vida destes pacientes (GONTIJO, 2000).

A eficácia do diagnóstico da doença de Chagas depende da fase da doença em que o paciente se encontra. Na fase aguda, por haver alta parasitemia, as técnicas parasitológicas como hemocultura, xenodiagnóstico e exame direto possuem alta sensibilidade, podendo esta chegar a 100%. Já as técnicas sorológicas não apresentam eficácia nas primeiras semanas, devido aos baixos níveis de anticorpos específicos (IgG). A fase crônica é caracterizada por baixíssima parasitemia e altos níveis de anticorpos IgG. Portanto, nesta fase o diagnóstico é feito basicamente por testes sorológicos, através das técnicas de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), Hemaglutinação Indireta (HAI) e Imunofluorescência Indireta (IFI), que apresentam sensibilidade variando de 95% a 100% (MORAES-SOUZA, 2000, LANGHI -

JUNIOR et al., 2002). Métodos parasitológicos como a Hemocultura, apresentam nesta fase sensibilidade baixa, variando de 40% a 50% (CHIARI, 1966; LIMA, 2001).

A Imunofluorescência Indireta (IFI) proposta por CAMARGO (1966) é uma reação muito sensível que consiste em fazer reagir sobre antígenos (extratos preparados de *Trypanossoma cruzi*), pré-fixados em lâminas de microscópio, anticorpos específicos existentes no soro do paciente, adicionando posteriormente o conjugado (antiglobulina marcada com substância fluorescente).

O teste de ELISA é um método dotado de grande sensibilidade. A reação se faz em tubos ou cavidades de placas plásticas, previamente sensibilizados com o extrato antigênico. Seguem-se incubações sucessivas, com o soro do paciente e com o conjugado imunoenzimático antiglobulínico e lavagens copiosas do recipiente plástico. Enchem-se, depois, as cavidades com solução de substrato adequado, que se torna corado pela ação da enzima, quando a reação é positiva (LIMA, 2001).

A Hemaglutinação Indireta (HAI), introduzida por BOYDEN (1951) e aperfeiçoada por STRAVISTKY (1954) é uma técnica simples e sensível, que consiste na verificação de aglutinação dos eritrócitos sensibilizados com extratos antigênicos de *Trypanossoma cruzi* em presença de anticorpos eventualmente contidos no soro a ser examinado.

A hemocultura é uma técnica parasitológica utilizada em serviços especializados para definição terapêutica anti-parasitária, controle de cura e confirmação diagnóstica. Consiste em semear o sangue do paciente com suspeita de doença de Chagas, previamente coletado em tubos com anticoagulante e centrifugado, em meio de cultura específico para o *Trypanossoma cruzi* (meio LIT). Mantém-se os tubos de cultura a 26-28⁰C, homogeneizando-os

semanalmente. São examinados uma vez por mês, até 90 dias, pesquisando a presença de formas epimastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* (CHIARI et al., 1979; GALVÃO, 1990).

Recentemente, técnicas moleculares vêm sendo métodos alternativos para o diagnóstico da doença de Chagas. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método confirmatório que consiste na amplificação de fragmentos de DNA do parasita, presentes em amostras de sangue, soro ou tecidos do paciente. Corresponde a uma técnica capaz de detectar o DNA do parasita em pequeno volume de sangue. Contudo, em diversas ocasiões não se conseguiu detectar a doença em pacientes com xenodiagnóstico positivo. (SANDLER, 1989; MORAES-SOUZA, 2000).

De maneira geral, o diagnóstico sorológico para a doença de Chagas é o método de escolha tanto em laboratórios clínicos como em bancos de sangue, apresentando os maiores coeficientes de sensibilidade. Contudo, o controle sorológico para doença de Chagas na hemorede pública, ainda requer a busca utópica de testes 100% sensíveis e específicos, que possam proteger o receptor de uma transfusão de sangue chagásico não identificada e que não traga ao doador o estigma de ser rotulado erroneamente como chagásico por falha na especificidade sorológica (MORAES-SOUZA et al., 2006).

1.2- Doença de Chagas e transfusão de sangue

A possibilidade de transmissão da tripanosomíase através da transfusão sangüínea foi inicialmente sugerida por MAZZA em 1936. Na década seguinte, os primeiros casos de doadores infectados foram detectados por PELLEGRINO et al., 1949. Dezesesseis anos após a descoberta de MAZZA, a transmissão transfusional da doença de Chagas foi definitivamente documentada no Brasil por PEDREIRA DE FREITAS em 1952.

A partir da década de 50, começou a haver crescimento do número de inquéritos sorológicos entre doadores de sangue e candidatos a doação de sangue em toda a América Latina, inicialmente com muitas dificuldades operacionais, devido ao problema de padronização da sorologia empregada - Fixação do Complemento (DIAS & SCHOFIELD, 1998). Nas décadas seguintes estes inquéritos foram facilitados pela incorporação de técnicas sorológicas mais adequadas e reprodutíveis como a Hemaglutinação Indireta, Imunofluorescência Indireta e ELISA (DIAS, 1979).

Por outro lado, a prática da transfusão de sangue se generalizou e expandiu pela América Latina a partir dos anos 40 (OPAS, 1994; WENDEL, 1997). Paralelamente viu-se o grande aumento de migração dos indivíduos chagásicos das zonas rurais para os centros urbanos de regiões não endêmicas (SCHMUNIS, 1997). Tudo isto contribuiu para aumentar significativamente o risco da doença de Chagas transfusional, de tal forma que na década de 70, a cada 100 mil casos novos de doença de Chagas por ano, no Brasil, 20 mil correspondiam à transmissão transfusional (DIAS, 1979).

No Brasil, a situação da Hemoterapia se destacou ainda mais após o advento da AIDS. Até a década de 80, pouco se sabia sobre a real situação da hemoterapia praticada na América Latina em geral, especialmente em relação às medidas empregadas no controle da doença de Chagas associada à transmissão sangüínea (MORAES-SOUZA, 1994). O aumento do número de casos de AIDS, associado ao caráter letal desta doença, sensibilizou a sociedade em geral de modo a induzir o Estado a assumir ação prioritária de manutenção do sistema hemoterápico brasileiro (GONTIJO, 1989).

Como resultado de um amplo movimento nacional, coordenado por profissionais da área e com ampla mobilização da sociedade, o Ministério da Saúde criou em 30 de abril de 1980, o Programa Nacional de Sangue - PRÓ SANGUE (MORAES-SOUZA et al., 1997). Com isto, teve início uma política efetiva com o objetivo de organizar, sistematizar e normatizar a utilização do sangue e hemoderivados, além de estimular a doação voluntária e promover maior número de pesquisas na área da hemoterapia.

Na década de 80, reunindo dados sobre a prevalência da infecção chagásica em candidatos a doadores de sangue, agruparam-se 60 inquéritos nacionais e 32 de outros países latino-americanos, que apresentaram índices de sorologia positiva para o *T. cruzi* que variavam de 0% a 25,8% no Brasil, e de 0% a 28% nos demais países, com prevalência média de 7% (MORAES-SOUZA et al., 1985). Na década de 90, um outro estudo analisou inquéritos sorológicos dos últimos 10 anos e verificou que de 1.522.117 exames realizados, entre doadores, 45.568 (2,9%) foram positivos para *T. cruzi*. No Brasil, os índices de prevalência variavam de 0,09% a 14,6%, e nos demais países, de 0% a 62,1%, incluindo os Estados Unidos (SCHMUNIS, 1991).

Diante dos dados sobre a transmissão transfusional da doença de Chagas, indicando o risco da expansão da doença nos centros urbanos, foram intensificadas as ações de controle da doença de Chagas, capitaneadas pela OPAS em diversos países da América Latina, tendo como ponto de partida a Iniciativa do Cone Sul, programa de controle da doença de Chagas, que teve como proposta a eliminação do vetor e formulação da Lei do Sangue nos seis países do Cone Sul (Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Chile), visando controlar a transmissão transfusional do *T. cruzi* (DIAS & SCHOFIELD, 1998).

A criação da Iniciativa do Cone Sul, em 1991, trouxe um imediato e significativo impacto no controle da doença de Chagas transfusional. No mesmo ano foram iniciadas reuniões técnicas com epidemiologistas e hemoterapeutas para normatizar as regras, os procedimentos e os insumos necessários à redução do risco da doença de Chagas transfusional (DIAS & SCHOFIELD, 1998).

Uma das prioridades da Iniciativa do Cone Sul foi a melhoria no padrão da sorologia realizada. Foi estabelecido que o controle sorológico pré-transfusional era mandatório e seguindo uma antiga determinação da OPAS, exigiu-se a realização de pelo menos duas técnicas sorológicas de princípios diferentes no sangue a ser transfundido, utilizando para isto técnicas mais confiáveis, simples e com melhores sensibilidade e especificidade do que a de Fixação do Complemento, que foi gradativamente substituída em toda a região (DIAS & SCHOFIELD, 1998).

As técnicas de Imunofluorescência Indireta e Hemaglutinação Indireta, desenvolvidas respectivamente nos anos de 1959 e 1970, foram definitivamente instituídas na triagem sorológica dos doadores de sangue, passando a ser por muitos anos, os testes de escolha nos

bancos de sangue para a exclusão de doadores. Um inquérito nacional, realizado no Brasil entre o fim dos anos 80 e início dos 90, revelou que estas reações eram empregadas por, respectivamente, 67,8% e 72,2% dos 850 serviços que realizavam sorologia (MORAES-SOUZA et al., 1994).

O emprego da técnica de ELISA para o diagnóstico da doença de Chagas data de 1975 (VOLLER, 1975). Empregando-se de início extratos de *T. cruzi* como antígeno, a técnica, apesar de alta sensibilidade, perdia em especificidade devido à possibilidade de reações cruzadas, em especial com *Leishmania sp* e *Trypanosoma rangeli* (MORAES-SOUZA, 2000). Com o emprego de proteínas purificadas e antígenos recombinantes, conseguiu-se melhorar a especificidade do teste sem comprometer a sensibilidade. Desde o início da década de 90, a escolha desta técnica para triagem sorológica de doadores aumentou rapidamente, passando de 14,3 % em 1988 para 60,2% em 1990 no Estado de São Paulo (ALMEIDA, 1997), sendo hoje a técnica recomendada pela legislação vigente (ANVISA, 2004 – portaria 153)

Desde 1993, as recomendações técnicas da Iniciativa do Cone Sul em relação à prevenção da doença de Chagas transfusional têm se fixado principalmente no aumento da cobertura sorológica do sangue a ser transfundido e na qualidade nos procedimentos hemoterápicos. A busca de maior sensibilidade nos testes continua sendo a principal preocupação para que se evite a transmissão do *T. cruzi* pela transfusão de sangue e componentes. Porém, progressivamente aumenta a busca de maior especificidade, para evitar-se o descarte desnecessário de bolsas de sangue e os constrangimentos que os resultados falso-positivos podem acarretar ao indivíduo (DIAS et al., 2002).

Atualmente, vem chamando a atenção a alta proporção de reações discrepantes ou indeterminadas nos bancos de sangue, que se caracterizam por amostras duvidosas em um determinado teste e positivas ou mesmo negativas em outro (SALES et al., 1996). Tais discrepâncias tornam-se mais evidentes e conflituosas em doadores de repetição e/ou fidelizados quando, após até mais de uma dezena de reações sorológicas repetidamente negativas em doações prévias, apresentam sorologia indeterminada ou eventualmente positiva em doação subsequente (SALLES et al., 1996; LANGHI-JÚNIOR et al., 2002).

Diferentes estudos têm demonstrado que no contexto atual, no Brasil e em outras regiões em que a endemia encontra-se sob controle, reações indeterminadas representam, freqüentemente, mais de 50% das inaptidões sorológicas para doença de Chagas e não raramente, são superiores a 80% (XVI REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSES). Estudos de SALLES et al., 1996 demonstraram que 69,6% das reações não negativas detectadas em 6.915 dos 411.617 doadores testados sorologicamente na Fundação Pró Sangue de São Paulo, através de três diferentes técnicas, eram inconclusivas. No caso do Brasil, estimando em 60% a ocorrência de reações indeterminadas nas três milhões de doações anuais, das quais 0,6% das bolsas coletadas são descartadas pela sorologia para *T. cruzi*, 10.800 estarão sendo descartadas por sorologia indeterminada (MORAES-SOUZA et al., 2006).

A ocorrência de reações indeterminadas (a maioria traduzindo falhas na especificidade dos testes sorológicos), faz com que muitos indivíduos sadios sejam rotulados como portadores de uma doença grave, levando a sérias conseqüências psicológicas, sociais e econômicas ao doador excluído, erroneamente rotulado de chagásico, além de promover o descarte

desnecessário de unidades de sangue nos hemocentros e importantes perdas financeiras para o Sistema Único de Saúde (SUS).

As dificuldades na abordagem e condução de doadores com reações sorológicas indeterminadas, a quase totalidade não-chagásicos, torna imprescindível a implementação de mecanismos que permitam minimizar, ou mesmo eliminar os resultados sorológicos duvidosos ou indeterminados para a doença de Chagas.

2. HIPÓTESE

- O conjunto de três testes sorológicos e um teste parasitológico usados no diagnóstico da doença de Chagas, realizados simultaneamente, permitirá definir com maior segurança o perfil sorológico de doadores de sangue com sorologia não negativa para esta doença.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar a ocorrência e o significado das reações sorológicas não-negativas para doença de Chagas entre os candidatos à doação de sangue do Hemocentro Regional de Uberaba no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2005.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Entre os doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberaba:

- Avaliar o perfil sorológico para doença de Chagas no período de 6 anos;
- Analisar as características demográficas e sociais do doador em geral e comparar com o doador inapto por sorologia positiva e indeterminada para *Trypanosoma cruzi*;
- Verificar a concordância dos resultados entre os testes realizados;
- Calcular e comparar a sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos e parasitológicos empregados no diagnóstico da doença de Chagas;
- Definir o perfil sorológico dos doadores com sorologia indeterminada.

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAL

Dados fornecidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba (unidade da FUNDAÇÃO HEMOMINAS), através da revisão das fichas cadastrais de candidatos à doação de sangue, que compareceram a este serviço no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2005.

4.2 CASUÍSTICA

4.2.1) Para análise do perfil sorológico para doença de Chagas e caracterização sócio-demográfica dos doadores inaptos

A população de estudo foi constituída por 269 candidatos à doação de sangue, distribuídos em dois grupos: com sorologia positiva (129 indivíduos) e indeterminada (140 indivíduos) para doença de Chagas. Os tópicos analisados foram obtidos através da revisão das fichas de cada um destes doadores. A partir desta análise, as seguintes variáveis foram associadas a cada um dos doadores:

- a) **Identificação:** iniciais do doador e número do registro no HRU.
- b) **Procedência:** cidade de origem de cada um.
- c) **Cor:** B (Branco); NB (não-branco: pardo, negro ou mulato)
- d) **Idade:** determinada pela subtração entre a data de nascimento e a data da última doação.

A distribuição dos doadores, em grupos com idade inferior ou igual a 30 anos e maiores que 30 anos, foi estabelecida em decorrência do fato de que os programas de controle nacional do vetor da doença de Chagas terem sido iniciados nos anos 70, ocasião em

e) **Sexo:** F- feminino; M- masculino.

f) **Tipo de doador:** Novo (aqueles que fizeram sua primeira doação no HRU entre janeiro de 2000 e dezembro de 2005); Retorno (aqueles que haviam feito pelo menos uma doação neste Serviço antes de janeiro de 2000).

g) **Resultado sorológico:** Positivo (aquele que apresentou resultados repetidamente positivos nas duas ou três técnicas realizadas para triagem sorológica para doença de Chagas no HRU); I- Indeterminado (que teve resultados sorológicos discordantes entre as duas técnicas).

h) **Profissão:** Os candidatos à doação foram agrupados segundo a lista nacional de profissões do IBGE (**anexo II**), considerando a atividade que exerciam na ocasião da doação. Foram classificadas de acordo com a qualificação profissional, assim definida:

- Qualificada: indivíduos com qualificação profissional específica para a função desempenhada, adquirida através de educação formal (cursos).
- Não-qualificada: indivíduos que não possuem capacitação técnica, não têm uma atividade definida e estão sujeitos a qualquer tipo de trabalho.

- Semi-qualificada: indivíduos que possuem habilidade, formação técnica mínima que pode ter sido obtida, informalmente, através da experiência prática.

4.2.2) Para avaliação da sensibilidade e especificidade dos testes realizados no HRU/ FUNDAÇÃO HEMOMINAS

A população de estudo foi composta por 60 candidatos à doação (convocados para participar da pesquisa) que tiveram sorologia positiva ou indeterminada para doença de Chagas no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2005 e por 30 doadores negativos. Foi estabelecido a classificação destes indivíduos em 3 grupos:

Grupo I Composto por 30 indivíduos com sorologia positiva que foram convocados a comparecerem no HRU para repetição de testes sorológicos e realização de um teste parasitológico.

Grupo II Composto por 30 indivíduos com sorologia indeterminada que foram convocados a comparecerem no HRU para repetição de testes sorológicos e realização de um teste parasitológico.

Grupo III Composto por 30 doadores de retorno, com sorologia sabidamente negativa, que compareceram ao HRU para doação no período de 26 a 28 de maio de 2006, dos quais foi colhida uma amostra de sangue para repetição de testes sorológicos.

4.3) PROCEDIMENTOS

4.3.1) Identificação dos procedimentos e técnicas utilizadas na triagem sorológica para doença de Chagas na FUNDAÇÃO HEMOMINAS / HRU

Ao comparecer ao Hemocentro Regional de Uberaba, o candidato à doação é inicialmente submetido à triagem clínica, como estabelecido pelo Ministério da saúde (Portaria 1396/MS, 1993 e ANVISA, RDC 153, 2004). É realizada por profissionais capacitados seguindo protocolo preestabelecido, através de anamnese pormenorizada, colhendo dados de identificação do doador e dados que possibilitem a identificação de doenças recentes ou pregressas, histórico de cirurgias ou transfusões, risco de contaminação por doenças sexualmente transmissíveis e outros dados que possam classificar o doador como inapto clínico temporário ou permanente à doação de sangue (**anexos III e IV**).

É feita ainda, a dosagem de hemoglobina do doador, fator excludente caso esta esteja fora dos valores de referência estabelecidos pelo Ministério da saúde (Portaria vigente). Nesta fase, avalia-se também parâmetros importantes como peso, pressão arterial e temperatura do candidato à doação.

Ao final da triagem clínica o doador assina a ficha cadastral, responsabilizando-se pelas informações nela contidas e autorizando a realização das provas sorológicas. No ato da doação o indivíduo é conscientizado sobre a possibilidade de reações falso-positivas, devido à alta

sensibilidade dos métodos, comprometendo-se a retornar ao hemocentro para coleta de 2ª amostra e repetição dos exames, em caso de reações positivas ou duvidosas. O Hemocentro Regional de Uberaba trabalha ainda com a auto-exclusão (**anexo V**), processo que pode detectar possíveis fatores de risco, admitidos pelo próprio doador e que não foram levantados na triagem clínica, diminuindo assim falhas que possivelmente possam ter ocorrido durante a entrevista.

No caso de aptidão clínica, o doador é encaminhado à sala de coleta, onde doa cerca de 400 ml de sangue total, além de amostras para realização de sorologia e exames imunohematológicos. A bolsa de sangue é então identificada e armazenada até a conclusão dos exames e autorização de liberação pelo próprio hemocentro.

A triagem sorológica para doença de Chagas no Hemocentro Regional de Uberaba / FUNDAÇÃO HEMOMINAS, foi realizada, inicialmente, por duas técnicas de princípios diferentes até 2004 (**figura 2**), como regulamentada pelo Ministério da Saúde (1993). Assim, entre os anos de 2000 e 2003 foram utilizadas as técnicas de ELISA e Imunofluorescência Indireta (IFI), sendo introduzida também em 2004, a técnica de Hemaglutinação Indireta (HAI) para repetição de reações positivas ou duvidosas.

- **ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)**

Para a realização desta técnica, foram utilizados reagentes ChagateK ELISA dos laboratórios Biomérieux[®], obedecendo ao método descrito por VOLLER (1975). Esta técnica utiliza enzimas que através de ação catalítica marcam os anticorpos IgG presentes no soro do paciente infectado, sensibilizados com a peroxidase, produzindo amostras coloridas. A olho nu,

as amostras que apresentam coloração mais intensa, claramente diferenciadas são consideradas reativas. A partir da leitura espectrofotométrica dos resultados, é feito o cálculo do valor do *cut off do próprio teste*, através das densidades ópticas dos controles negativos (fornecidos pelo fabricante). A amostra é considerada não-reativa se o *cut off* do paciente for inferior ao valor do *cut off* do teste e reativa, se for superior.

Em bancos de sangue, reações com valores a mais ou menos 20% do *cut off* do teste, que caem na chamada área cinza ou boderline, são consideradas indeterminadas, isto é, não definidas, e devem ser repetidas.

- **IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)**

Realizada utilizando-se reagentes fornecidos pela Biomérieux[®], segundo metodologia proposta por CAMARGO (1966), em que anticorpos presentes no soro do paciente chagásico, quando incubados sobre lâmina de vidro previamente sensibilizada com antígenos do *Trypanosoma cruzi*, são revelados através de um conjugado anti-globulina humana marcada com Isotiocianato de Fluoresceína, que produz coloração fluorescente nos parasitas em casos positivos, visualizados através de microscópio de fluorescência.

- Reações positivas as formas do parasita são vistas como estruturas bem coradas, nitidamente delimitadas por fluorescência verde.

- Reações indeterminadas há fluorescência duvidosa, de apenas parte do parasita, nestes casos a reação é repetida para confirmação dos resultados.
- Reações negativas os parasitas permanecem como manchas foscas e irregulares com fraca fluorescência interior.

Em bancos de sangue a diluição do soro pra realização da técnica de IFI, é de 1:20 para alcançar máxima sensibilidade, o que pode acarretar resultados falso-positivos.

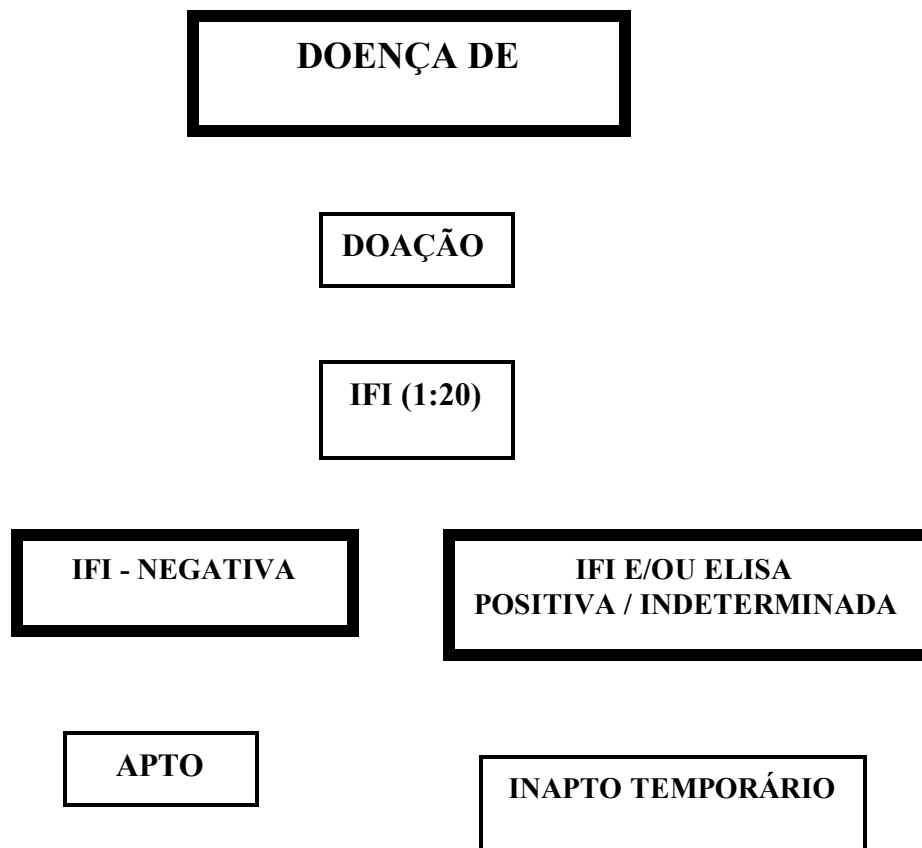
- **HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA (HAI)**

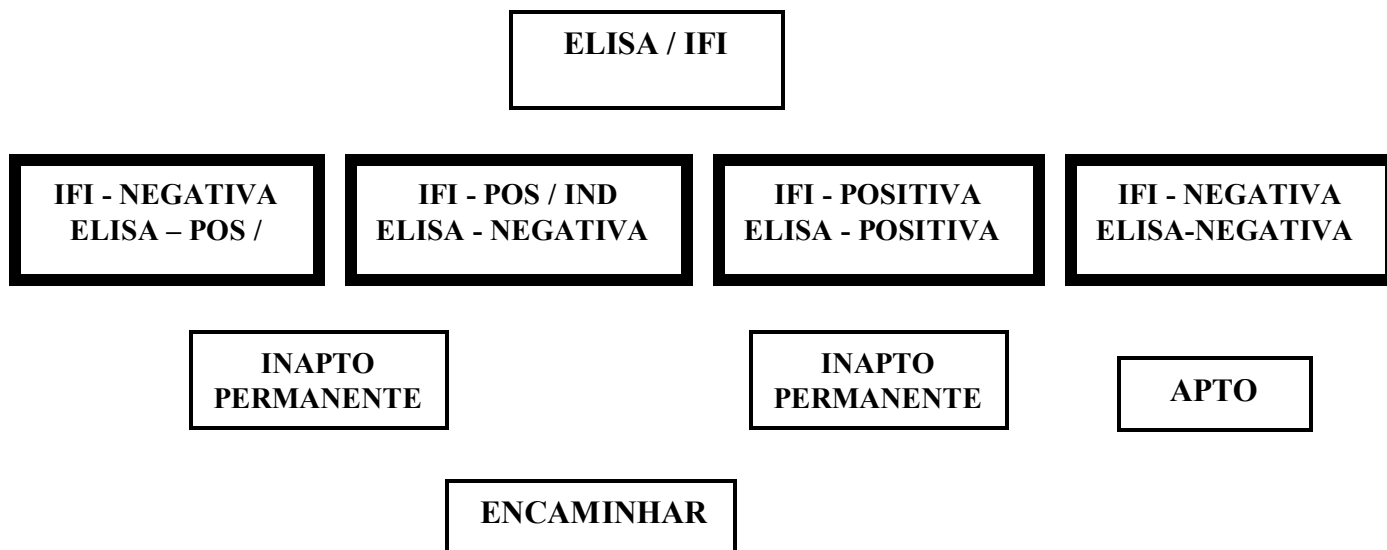
Utilizou-se kits da BioMérieux[®], segundo metodologia descrita por MIDDLEBROOK & DUBOS (1948), que utiliza hemácias recobertas por antígenos solúveis de *T. cruzi*, que se aglutinam na presença de anticorpos, eventualmente contidos no soro do paciente. Foi realizado teste qualitativo, diluindo-se o soro em PBS na proporção de 1:20. A interpretação dos resultados foi feita após uma hora de incubação do soro do paciente com as hemácias sensibilizadas em temperatura ambiente. A análise é simples sendo feita a olho nu, na qual são consideradas:

- Reação positiva Forma-se um véu uniforme de hemácias, recobrimdo toda a cavidade da placa.
- Reação negativa: Forma-se um botão compacto de hemácias no fundo da cavidade.

- Reação indeterminada: Forma-se um véu pouco nítido, recobrando cerca de metade da superfície da placa, podendo haver depósito de hemácias no fundo da cavidade. Nestes casos a reação deve ser repetida.

Figura 2) Algoritmo para triagem sorológica da doença de Chagas na FUNDAÇÃO HEMOMINAS, julho / 2000.





Fonte: Hemocentro Regional de Uberaba – Laboratório de Sorologia.

Desde 2004, a FUNDAÇÃO HEMOMINAS utiliza o algoritmo representado na **figura 3** para triagem sorológica da doença de Chagas. A partir dele realiza-se inicialmente apenas a técnica de ELISA e em casos positivos ou duvidosos, persistentes na 2ª amostra, realiza-se também a técnica de IFI para confirmação dos resultados.

4.3.2) Convocação dos doadores inaptos sorológicos para doença de Chagas

Os doadores foram convocados através de telefonema, a comparecerem ao HRU em data pré-estabelecida, para coleta de amostras de sangue para realização de três testes sorológicos e um teste parasitológico, além de responder a uma ficha de investigação epidemiológica (**anexo VII**). Em princípio foram convidados aleatoriamente indivíduos com sorologia positiva e indeterminada por técnicas anteriormente realizadas no HRU. Contudo,

devido ao alto índice de pessoas não encontradas ou com residência fora de Uberaba, foram estabelecidos os critérios de exclusão (**Figura 4**) e optou-se pela decisão de pareamento entre três grupos: positivos, indeterminados e negativos (grupo controle), cada um composto por 30 indivíduos.

4.3.3) Avaliação epidemiológica dos doadores convocados

Ao comparecer ao HRU, os doadores assinaram a um termo de consentimento (**anexo VI**) autorizando a realização de testes sorológicos e parasitológicos, e responderam a uma ficha epidemiológica (**anexo VII**) em que constam alguns fatores predisponentes à infecção chagásica, como procedência, antecedentes familiares para a doença e risco de contaminação por sangue e hemoderivados. Nesta ficha constam, também, características sócio-demográficas do doador para posterior comparação entre os três grupos.

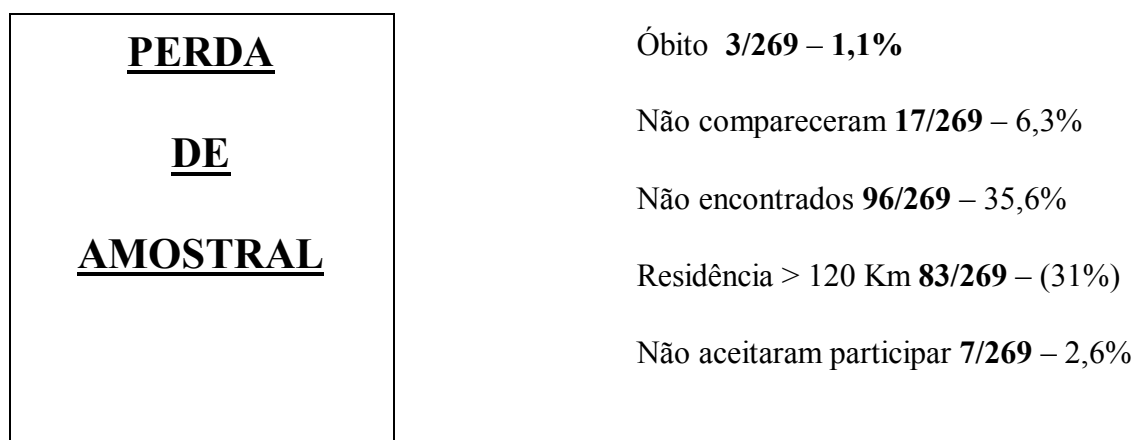


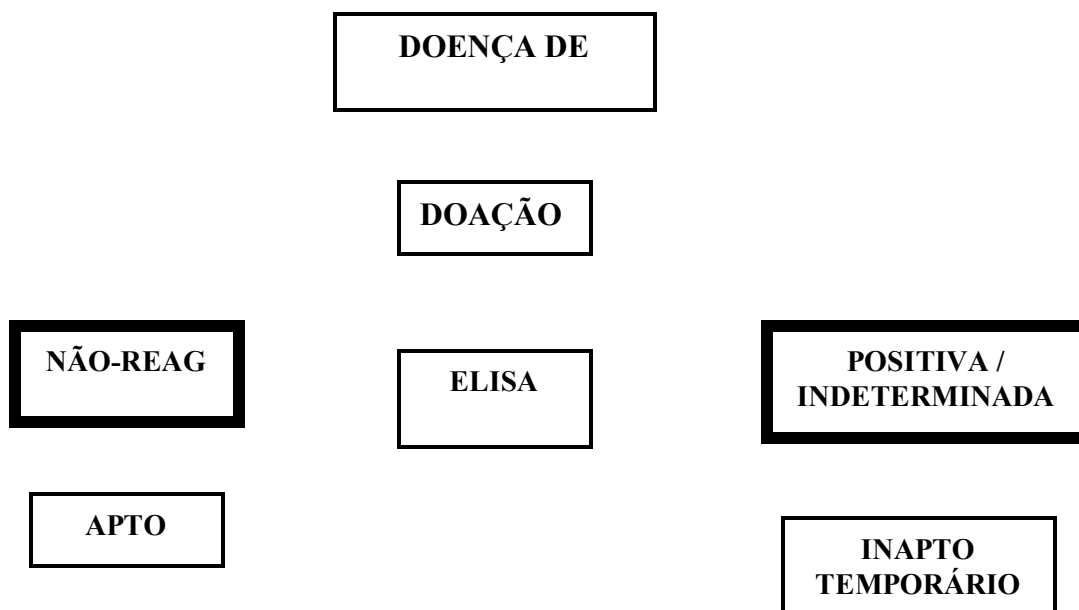
Figura 4) Critérios de exclusão para a convocação dos 269 doadores não-negativos para doença de Chagas

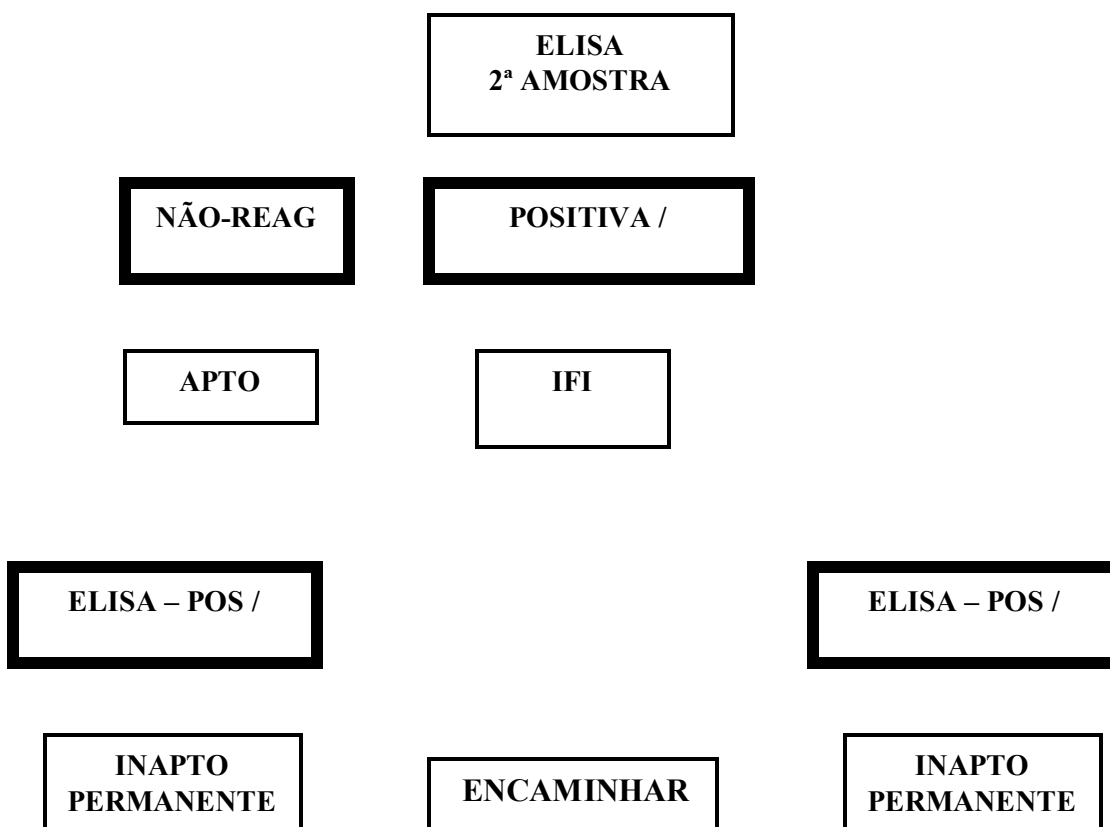
4.3.4) Coleta de sangue

Para coleta de sangue foram utilizados materiais fornecidos pela FUNDAÇÃO HEMOMINAS. No total, foram coletados 8 tubos de sangue total de cada um dos 60 doadores não-negativos, dos quais: 1 tubo de 6mL para repetição dos testes sorológicos colhidos em tubos com gel e sem anticoagulante, 5 tubos para realização do teste de Hemocultura colhidos em tubos com EDTA e 2 tubos para realização futura de um teste de Biologia Molecular (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) também em EDTA.

Para o grupo controle foi colhido apenas 1 tubo de sangue para realização de testes sorológicos.

Figura 3) Algoritmo utilizado na triagem sorológica para doença de Chagas na FUNDAÇÃO HEMOMINAS / 2004.





Fonte: Hemocentro Regional de Uberaba – Laboratório de Sorologia

4.3.5) Armazenamento do material

Os tubos de sangue destinados à realização de sorologia foram previamente centrifugados a 3.500 RPM durante 5 minutos. O soro foi separado do sedimento de hemácias e colocado em tubos eppendorfs (1,5mL), sendo posteriormente congelado a -25°C até a data de processamento.

Para realização da hemocultura não houve armazenamento do material, sendo este processado imediatamente após a coleta.

Para a realização futura da técnica de PCR os tubos de sangue foram despejados em solução de guanidina (hidroclorato de guanidina, hidróxido de sódio e EDTA), previamente preparada no Laboratório de Parasitologia Humana da UFTM e armazenados a -25°C .

4.3.6) Processamento do material

4.3.6.1) SOROLOGIA

Após o término da coleta de sangue de todos os 90 indivíduos convocados (inclusive os controles), os testes sorológicos (ELISA, IFI e HAI) foram realizados, simultaneamente, no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Escola da UFTM – Setor de sorologia, obedecendo à mesma metodologia descrita anteriormente, diferindo-se apenas nas diluições do soro e ponto de corte.

ELISA realizado com reagentes Chagatest da Wiener Lab[®]. A diferença da utilização da técnica em bancos de sangue e em laboratórios clínicos está no cálculo do ponto de corte. Enquanto em bancos de sangue calcula-se uma zona de indeterminação para o teste do doador entre $\pm 20\%$ do valor de cut off do teste, aumentando assim a sensibilidade do método, em laboratórios de rotina é utilizada como padrão uma zona de $\pm 10\%$.

IFI realizada com reagentes da BioMérieux[®]. Para realização desta técnica, o soro de cada doador foi diluído a 1:40, diferindo da técnica de bancos de sangue que processa o soro em menor diluição (1:20). Para a realização da leitura utiliza-se a mesma metodologia anteriormente descrita.

HAI utilizou-se reagentes da BioMérieux[®] a partir de técnica qualitativa. A técnica aqui utilizada foi idêntica à da FUNDAÇÃO HEMOMINAS, diferindo apenas na diluição do soro (1:40 – padrão de laboratórios clínicos).

4.3.6.2 TESTE PARASITOLÓGICO - HEMOCULTURA

A técnica de hemocultura foi realizada no Laboratório de Parasitologia Humana da UFTM, sendo os reagentes adquiridos com o apoio financeiro da FAPEMIG e CAPES.

Foi feita uma padronização visando a otimização da técnica proposta por CHIARI et al., 1979 e GALVÃO (1990). Consistiu em semear o sangue do doador com suspeita da doença de Chagas, colhido em tubo contendo EDTA, previamente centrifugado a 3.500 RPM a 4⁰C por 10 minutos, em meio de cultura específico para *Trypanossoma cruzi* (meio LIT), anteriormente preparado nesse laboratório. Mantiveram-se os tubos em cultura a 28⁰C, realizando-se leitura entre lâmina e lamínula em aumento de 100x, após 30, 60 e 90 dias, para pesquisa de formas epimastigotas ou tripomastigotas do *Trypanossoma cruzi* entremeados às hemácias do paciente.

4.3.7) Cálculo da sensibilidade e especificidade

Para o cálculo da sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos realizados no HRU no período de 2000 a 2005, analisou-se o resultado das 95.990 doações recebidas no Serviço durante este período. Consideramos os 140 doadores indeterminados como falso positivos (FP), obtendo assim valores estimados para os dois parâmetros.

A sensibilidade e especificidade dos testes realizados no Laboratório Central do HE/UFTM, entre os 90 doadores convocados, foram calculadas a partir dos resultados sorológicos dos 30 candidatos à doação com sorologia positiva e dos 30 negativos (grupo controle), não incluindo, portanto, os doadores com sorologia indeterminada no HRU.

A) SENSIBILIDADE

Corresponde à probabilidade de um teste dar positivo numa população de doentes, ou seja, avalia a capacidade do teste detectar a doença quando ela está realmente presente. Para o cálculo da sensibilidade, montou-se inicialmente uma tabela de dupla entrada mostrando a relação:

Tabela 1) Tabela de dupla entrada para o cálculo de sensibilidade e especificidade dos testes

TESTE	DOENÇA		TOTAL
	Presente	Ausente	
Positivo	VP	FP	VP + FP
Negativo	FN	VN	FN + VN

TOTAL	VP + FN	FP + VN	(N)
--------------	----------------	----------------	------------

VP: verdadeiros positivos; **FP:** falso positivos; **FN:** falso negativos e **VN:** verdadeiros negativos

A partir desta tabela, calcula-se o coeficiente de sensibilidade (S) do teste através da fórmula:

$$S = \frac{VP}{\text{_____}}$$

B) ESPECIFICIDADE

Corresponde à probabilidade do teste dar negativo numa população em que a doença está ausente, ou seja, avalia a capacidade do teste afastar a doença quando ela está ausente. Para o cálculo do coeficiente de especificidade (E) utiliza-se também a tabela de dupla entrada ilustrada acima, a partir da fórmula:

$$E = \frac{VN}{\text{_____}}$$

4.4) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi elaborado um banco de dados em planilha eletrônica no programa Microsoft Excel contendo dados gerais dos doadores.

Os dados foram analisados com o programa GraphPad InStat[®] versão 3.06 para Windows, conforme se segue.

4.4.1) Para avaliação da ocorrência de reações sorológicas não-negativas para doença de Chagas nos últimos 6 anos

Foi utilizada estatística descritiva, através de cálculos de proporções e porcentagens.

Para análise da ocorrência de sorologia positiva ou indeterminada, por ano e por faixa etária, foi calculado o Coeficiente de Correlação Linear de Pearson (R^2), obedecendo-se a relação:

- $-1 \leq r \leq -0,8$ relação linear forte inversamente proporcional
- $-0,8 < r < -0,5$ relação linear moderada inversamente proporcional
- $-0,5 < r \leq 0$ relação linear de fraca para nula
- $0 \leq r < +0,5$ relação linear de fraca para moderada diretamente proporcional
- $0,5 \leq r < +0,8$ relação linear moderada diretamente proporcional
- $0,8 \leq r \leq 1,0$ relação linear forte diretamente proporcional

Sendo que: $R^2 = r^2$ (ARANGO, 2005).

4.4.2) Para análise das características sócio-demográficas dos doadores com sorologia não-negativa para doença de Chagas

Foi utilizado o teste de comparação de proporções (teste Z) para as variáveis tipo de doador, sexo e idade, comparando-se os doadores inaptos sorológicos com os doadores em geral do HRU, nos últimos 6 anos.

Para o estudo de associação entre as características sócio-demográficas e o resultado sorológico (positivos e indeterminados) foi utilizado o teste do Qui-quadrado.

Os resultados foram considerados significativos quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

4.4.3) Para análise de concordâncias entre os testes realizados no HRU para os 269 doadores não-negativos para doença de chagas

Foi calculado o índice *Kappa* (*K*) para verificação de resultados concordantes entre os testes de ELISA, IFI e HAI, conforme dados da tabela de dupla entrada:

Tabela 2) Tabela de dupla entrada para cálculo do índice *kappa*.

TESTE 1	TESTE 2		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	A	B	A + B
NEGATIVO	C	D	C + D
TOTAL	A + C	B + D	(N)

Sendo:

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

$$P_o = \frac{A \cdot D}{(A + B)(C + D)}$$

$$P_e = \frac{\{(A+B)(A+C)\} + \{(C+D)(B+D)\}}{(A+B)(C+D)}$$

A análise foi feita segundo valores estabelecidos do índice *kappa*, sendo considerado:

VALORES DE KAPPA	CONCORDÂNCIA
< 0,00	Péssima
0,00 – 0,20	Ruim
0,21 – 0,40	Fraca
0,41 – 0,60	moderada
0,61 – 0,80	Boa

0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Fonte: FLEISS, 1985.

4.4.4) Para análise da sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos realizados no HRU e no Laboratório Central do HE / UFTM

Foram calculados os coeficientes de sensibilidade (*S*) e especificidade (*E*) para cada teste, utilizando-se para isto, uma tabela de dupla entrada (demonstrada anteriormente), relacionando (doença x resultado do teste).

4.4.5) Outras análises

Foi realizado o teste de Dunn para a comparação das medianas dos valores de *cut off* para os 3 grupos de doadores.

Para a análise de associação entre os antecedentes para doença de Chagas e a presença da doença foi calculado o risco relativo (RR), utilizando a tabela:

Tabela 3) Tabela de dupla entrada para o cálculo do risco relativo (RR)

DOENÇA	ANTECEDENTE	
	SIM	NÃO
PRESENTE	a	b
AUSENTE	c	d
TOTAL	a+c	b+d

A partir da tabela, calcula-se as probabilidades de um indivíduo que apresenta um antecedente ter a doença de Chagas ($P(a/b) = a/a+c$), e de um que não apresenta antecedente ter a doença de Chagas ($P(a/b') = b/b+d$). O cálculo do risco relativo corresponde à relação entre estas duas probabilidades:

$$RR = \frac{P(a/b)}{P(a/b')}$$

Sendo que:

- $RR < 1$ proteção
- $RR > 1$ risco

Juntamente com o cálculo do risco relativo foi calculado, através do programa estatístico, o intervalo de confiança referente a cada valor (IC (RR)). A interpretação dos valores do risco relativo depende, portanto deste intervalo:

- **IC (RR) $LI \leq 1 \leq LS$** risco não significativo
- **IC (RR) $LI > 1 < LS$** risco significativo.

(Fonte: ARANGO, 2005).

5. RESULTADOS

5.1) Avaliação do perfil sorológico para doença de Chagas dos doadores de sangue do HRU nos últimos 6 anos

Nos últimos seis anos foram realizadas no Hemocentro Regional de Uberaba um total de 95.990 doações, das quais 269 (0,28%) foram de indivíduos com sorologia não-negativa para doença de Chagas, sendo 129 (48%) positivos e 140 (52%) indeterminados (**figura 5**).

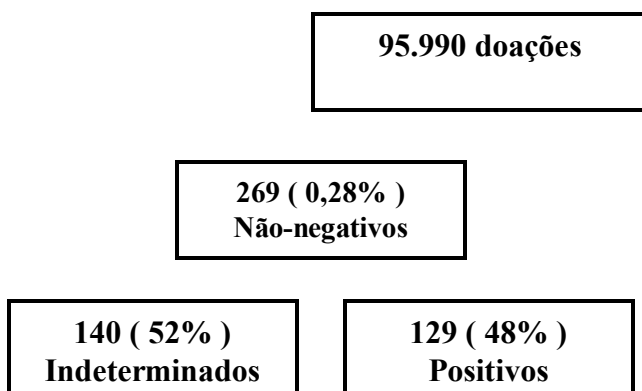


Figura 5) Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas atendidos no HRU no período de 2000 a 2005.

Do total de bolsas de sangue coletadas entre 2000 e 2005 (95.990), 16.859 (18%) foram de doadores novos e 79.131 (82%) de doadores de retorno (**tabela 4**). A proporção de

doadores com sorologia positiva para doença de Chagas no grupo de doadores novos (0,76%) foi significativamente superior a do grupo de retorno (0,0012%), com $p < 0,0001$. Diferença significante foi observada também, nos resultados indeterminados, sendo que no grupo de doadores novos (0,4%) a proporção foi significativamente superior a do grupo de retorno (0,09%) com $p < 0,0001$.

Tabela 4- Ocorrência de inaptidão sorológica para doença de Chagas entre doadores novos e de retorno do HRU no período de 2000 a 2005.

DOADORES	TOTAL DE DOAÇÕES	INAPTOS SOROLÓGICOS PARA CHAGAS		
		Positivos	Indeterminados	TOTAL
NOVOS	16.859 (18%)	128 (0,76%)*	67 (0,4%)*	195 (1,1%)
RETORNO	79.131 (82%)	1 (0,0012%)	73 (0,09%)	74 (0,09%)
TOTAL	95.990 (100%)	129 (0,13%)	140 (0,15%)	269 (0,28%)

* $p < 0,0001$

A avaliação dos doadores quanto ao gênero evidenciou que 27% (26.265) foram do sexo feminino e 73% (69.725) do sexo masculino (**tabela 5**). A proporção de doadores positivos no grupo feminino (0,2%) foi significativamente superior a do grupo masculino (0,1%), sendo $p = 0,0005$. Não foi observada associação significativa entre sorologia indeterminada e o gênero dos doadores ($p = 0,39$).

Tabela 5 – Distribuição dos doadores do HRU aptos e inaptos sorológicos para doença de Chagas, quanto ao gênero, no período de 2000 a 2005.

SEXO	TOTAL DE DOAÇÕES	INAPTOS SOROLÓGICOS PARA CHAGAS		
		Positivos	Indeterminados	TOTAL
FEMININO	26.265 (27%)	53 (0,2%) *	32 (0,12%) **	85 (0,32%)

MASCULINO	69.725 (73%)	76 (0,1%)	108 (0,15%)	184 (0,26%)
------------------	-----------------	-----------	-------------	-------------

TOTAL	95.990 (100%)	129 (0,13%)	140 (0,15%)	269 (0,28%)
--------------	---------------	-------------	-------------	-------------

* $p < 0,0005$

** $p = 0,39$

Os doadores foram distribuídos ainda, quanto à idade, em dois grupos. O primeiro com idade inferior ou igual a 30 anos e o segundo com idade superior a 30 anos (**tabela 6**). Observou-se que nos últimos 6 anos, a maioria das doações recebidas pelo Hemocentro Regional de Uberaba foram de doadores com idade superior a 30 anos (52%), sendo também nesse grupo encontrada a maior ocorrência de inaptidão sorológica para Chagas. A proporção de positivos no grupo maior de 30 anos (0,20%) foi significativamente superior a do grupo com idade igual ou inferior a 30 anos (0,05%), sendo $p < 0,0001$. Não foi observada associação significativa entre sorologia indeterminada e a idade dos doadores ($p = 0,078$).

Tabela 6 – Distribuição dos doadores do HRU aptos e inaptos sorológicos para doença de Chagas, quanto à idade, no Período de 2000 a 2005.

IDADE	TOTAL DE DOAÇÕES	INAPTOS SOROLÓGICOS PARA CHAGAS		
		Positivos	Indeterminados	TOTAL
≤ 30 ANOS	45.423(48%)	25 (0,05%)	59 (0,13%)	87 (0,18%)
> 30 ANOS	50.567(52%)	104 (0,20%)*	81 (0,16%)**	182 (0,36%)
TOTAL	95.990(100%)	129 (0,13%)	140 (0,15%)	269 (0,28%)

* $p < 0,0001$

** $p = 0,078$

A distribuição dos doadores em cinco faixas etárias evidenciou uma correlação linear forte diretamente proporcional entre a idade e proporção de doadores positivos (*pearson* (r)= 0, 88), como demonstrado na **figura 6**.

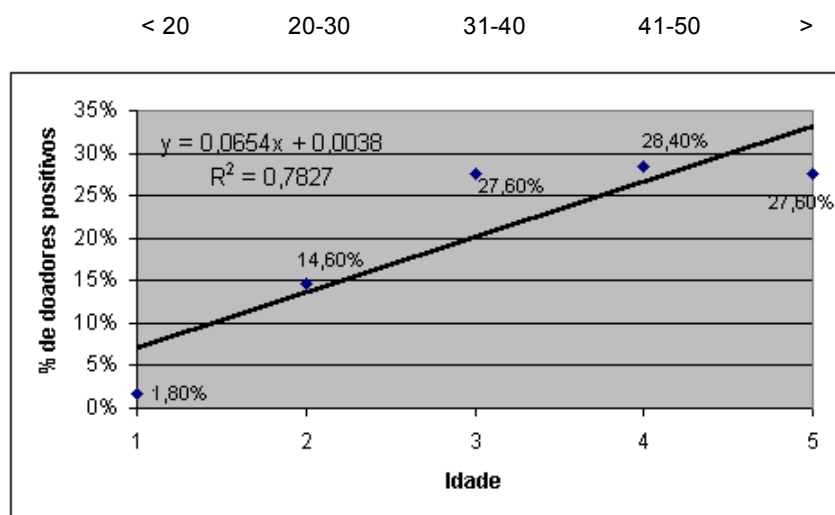


Figura 6) Distribuição dos doadores com sorologia positiva para doença de Chagas em cinco faixas etárias.

Quanto aos doadores com sorologia indeterminada, observou-se, através do coeficiente de correlação linear de *Pearson* (r), que houve relação de fraca para nula entre a idade e o resultado sorológico ($r = -0,09$).

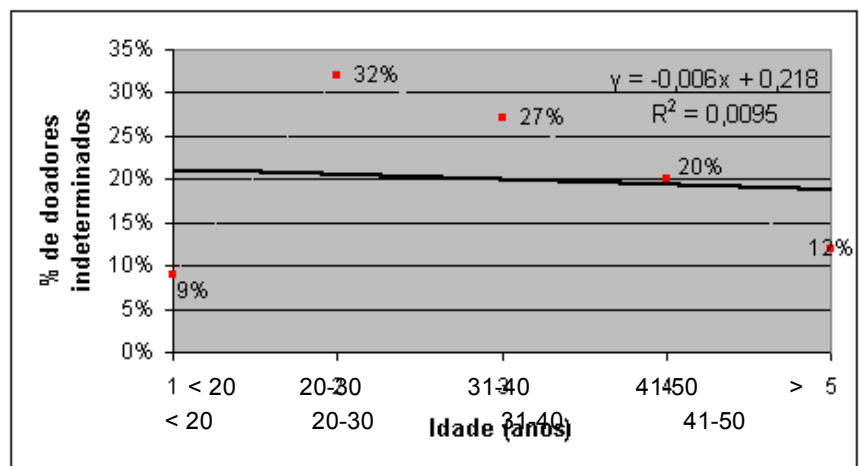


Figura 7) Distribuição dos doadores com sorologia indeterminada para doença de Chagas em cinco faixas etárias.

A **figura 8** mostra a relação entre a ocorrência de positividade para doença de Chagas ao longo dos últimos 6 anos, demonstrando que há uma correlação linear forte inversamente proporcional (*Pearson* (r) = $-0,924$), ou seja, a cada ano a ocorrência de sorologia positiva entre os doadores de sangue do HRU diminuiu gradativamente.

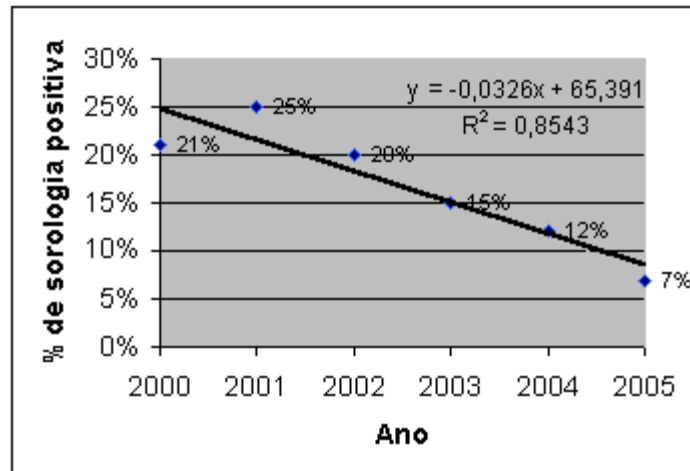


Figura 8) Distribuição dos doadores positivos para doença de Chagas quanto ao ano.

Já a **figura 9** mostra a relação entre a ocorrência de sorologia indeterminada para doença de Chagas ao longo dos últimos 6 anos, demonstrando que há uma correlação linear moderada inversamente proporcional (*Pearson* (r)= -0,794).

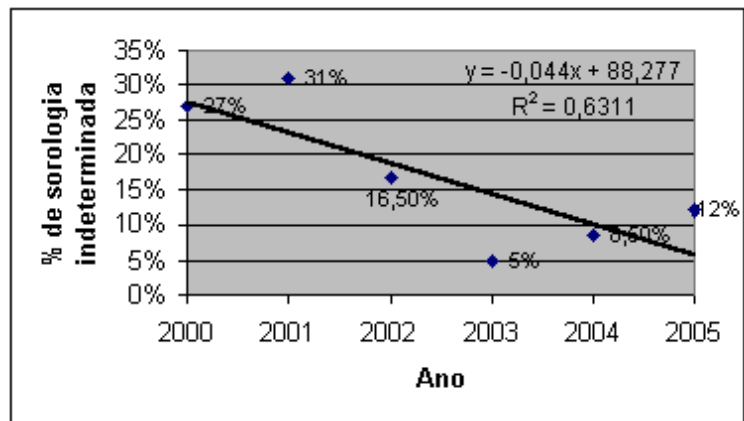


Figura 9) Distribuição dos doadores indeterminados para doença de Chagas quanto ao ano.

5.2) Caracterização sócio-demográfica dos doadores não-negativos

A **figura 10** ilustra a distribuição dos 269 doadores não-negativos para doença de Chagas quanto ao tipo de doador (novo ou de retorno). Dos 129 doadores com sorologia positiva, 99,2% foram doadores novos ou de primeira vez (128) e apenas 0,8% (1 doador) foi de retorno. Entre os 140 indeterminados, 48% foram doadores novos (67) e 52% de retorno (73 doadores). Observou-se que o número de doadores novos no grupo dos positivos é significativamente superior ao do grupo de retorno, com $p < 0,0001$.

$$(\chi^2 = 16,8; p <$$

Figura 10)

Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas quanto ao tipo de doador.

Quanto à cor, brancos e não-brancos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os candidatos à doação com sorologia positiva e com sorologia indeterminada ($p= 0,86$) (figura 11).

36%

($X^2 = 0,03; p = 0,86$)

11)
Distribuição dos
doadores não-negativos para doença de Chagas quanto à cor.

Figura
doadores

A avaliação dos doadores não-negativos, quanto ao sexo, evidenciou que entre os positivos 59% (76) foram do sexo masculino e 41% (53) do sexo feminino (**figura 12**). Entre os indeterminados 77% (108) foram do sexo masculino e 23% (32) do sexo feminino. Portanto, o índice de indivíduos do sexo masculino entre os não-negativos foi significativamente superior ao do sexo feminino ($p= 0,001$).

$$(X^2 = 10,4; p=0,001)$$

Figura 12) Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas quanto ao sexo.

A distribuição quanto à idade demonstrou que 81 % dos candidatos à doação com sorologia positiva (104) foram maiores de 30 anos e apenas 19% (25) menores de 30 anos ($p < 0,0001$). Entre os indeterminados também houve maioria (58%) entre os maiores de 30 anos (**figura 13**).

Figura 13) Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas quanto à idade. $(\chi^2 = 15,3; p < 0,0001)$

A análise quanto à procedência demonstrou que a grande maioria, tanto entre os positivos (96%) quanto nos indeterminados (85%), foram procedentes de regiões consideradas endêmicas para doença de Chagas. Observou-se que o índice de indivíduos procedentes destas regiões foi significativamente superior ao de indivíduos de regiões não-endêmicas ($p < 0,0001$) (figura 14).

($\chi^2 = 25$; $p < 0,0001$)

Fig
ura 14) Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas quanto à procedência.

Quanto à ocupação, os candidatos à doação foram distribuídos em 3 níveis de profissão: qualificada, semi-qualificada e não qualificada. Observou-se, tanto entre os positivos quanto nos indeterminados, pequena predominância de indivíduos semi-qualificados (**figura 15**). Contudo, não foi observada associação significativa entre a ocupação e o resultado sorológico dos indivíduos ($p = 0,21$).

($\chi^2 = 4,5$; $p = 0,21$)

Figura **15)**
Distribuição dos doadores não-negativos para doença de Chagas quanto à profissão.

5.3) *Análise dos testes sorológicos utilizados na triagem sorológica para doença de Chagas no Hemocentro Regional de Uberaba*

A partir da **tabela 7** observa-se que entre os 269 candidatos à doação com sorologia não-negativa para doença de Chagas que compareceram ao HRU entre 2000 e 2005, 96% foram triados pela técnica de ELISA, 84% pela IFI e 26% pela HAI.

Tabela 7) Proporção de cada teste utilizado na triagem sorológica para doença de Chagas entre doadores não-negativos para doença de Chagas no período de 2000 a 2005.

TESTE	TRIAGEM SOROLÓGICA DOS NÃO-NEGATIVOS	(%)
ELISA	258 / 269	96%
IFI	227 / 269	84%
HAI	70 / 269	26%

A **tabela 8** mostra a quantidade de doadores que utilizaram em conjunto, pelo menos duas técnicas sorológicas. Observa-se que a maior parte dos indivíduos não-negativos (64% dos positivos e 83% dos indeterminados) foram triados pelas técnicas de ELISA e IFI.

Tabela 8) Tipos de testes utilizados na triagem sorológica dos doadores não-negativos para doença de Chagas no período de 2000 a 2005.

TRIAGEM SOROLÓGICA	POSITIVOS	INDETERMINADOS
IFI + ELISA	83 (64%)	116 (83%)
IFI + HAI	7 (5,5%)	2 (1,5%)
ELISA + HAI	20 (15,5%)	22 (15,5%)
ELISA + IFI + HAI	19 (15%)	0 (0%)
TOTAL	129 (100%)	140 (100%)

Nas tabelas 9, 10 e 11 estão representadas as concordâncias entre os testes: ELISA x IFI, ELISA x HAI e HAI x IFI, respectivamente. Para cada conjunto de teste foi calculado o coeficiente *Kappa* (*k*) para análise destas concordâncias.

Tabela 9) Tabela de dupla entrada utilizada par cálculo da concordância entre os testes de ELISA e IFI.

IFI	+	-	TOTAL
ELISA			
+	119	19	138
-	80	71.572	71.652
TOTAL	199	71.591	71.790

(Índice Kappa (K)= 0,6; Concordância moderada)

Tabela 10) Tabela de dupla entrada utilizada par cálculo da concordância entre os testes de ELISA e HAI.

HAI	+	-	TOTAL
ELISA			
+	41	19	60
-	1	18.701	18.702
TOTAL	42	18.720	18.762

(Índice Kappa (K)= 0,66; Concordância boa)

Tabela 11) Tabela de dupla entrada utilizada par cálculo da concordância entre os testes de IFI e HAI.

HAI	+	-	TOTAL
IFI			
+	27	0	27
-	1	5.410	5.411
TOTAL	28	5.410	5.438

(índice Kappa (K)= 0,5; Concordância moderada).

De acordo com os valores do índice *Kappa*, observa-se que o conjunto de testes sorológicos que apresentou melhor concordância foi ELISA x HAI ($K=0,66$), que tiveram uma concordância considerada boa seguido, respectivamente, por ELISA x IFI ($K= 0,6$) e HAI x IFI ($K= 0,5$), que tiveram concordância moderada.

Procedemos também com o cálculo de sensibilidade e especificidade das três técnicas empregadas na triagem sorológica das 95.990 doações recebidas pelo HRU nos últimos seis anos. Estas análises estão demonstradas nas **tabelas 12 a 14**.

Tabela 12) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade da HAI / HRU.

HAI	DOENTES	NÃO-DOENTES	TOTAL
+	46	5	51
-	1	24.078	24.079
TOTAL	30	30	24.130

$$\text{Sensibilidade (S)} = 97,9\%$$

Tabela 13) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade da IFI / HRU.

IFI	DOENTES	NÃO-DOENTES	TOTAL
+	108	41	149
-	1	76.918	76.919

TOTAL	30	30	77.068
--------------	-----------	-----------	---------------

Sensibilidade (S) = 99%

Tabela 14) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade do ELISA / HRU.

ELISA	DOENTES	NÃO-DOENTES	TOTAL
+	121	121	242
-	1	90.309	90.310
TOTAL	122	90.430	90.552

Sensibilidade (S) = 99,2%

A partir da análise das tabelas, observa-se que 90.552 amostras de sangue coletadas entre 2000 e 2005, no HRU, foram triadas pela técnica de ELISA, 77.068 pela IFI e 24.130 pela HAI. A sensibilidade das técnicas variou de 97,9% para HAI, 99,2% para ELISA e 99% para IFI. E a especificidade foi de 99,9% para HAI e IFI e 99,8% para ELISA.

O número de falso-positivos foi estabelecido considerando-se os 140 doadores com sorologia indeterminada que realizaram cada tipo de teste. Estas análises foram realizadas a partir dos dados da **tabela 15**. O único indivíduo falso-negativo (considerado nas três técnicas) foi referente à análise da tabela 4, que mostra um doador positivo no grupo de doadores de retorno, indicando, portanto que pode ter havido falha na sensibilidade dos testes realizados anteriormente.

Tabela 15) Distribuição dos 140 candidatos à doação com sorologia indeterminada para doença de Chagas quanto aos resultados de cada teste.

RESULTADO SOROLÓGICO				
TESTE	POSITIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	TOTAL
HAI	3 (13%)	18 (78%)	2 (8,6%)	23 (100%)
IFI	11 (9%)	81 (66%)	30 (25%)	122 (100%)
ELISA	47 (34%)	17 (12%)	74 (54%) * **	138 (100%)

* ELISA x IFI: $p < 0,0005$

** ELISA x HAI: $p < 0,0001$

Considerou-se como falso-positivos em cada teste, a soma de indivíduos com resultados sorológicos positivos e inconclusivos, sendo respectivamente 5 para HAI, 41 para IFI e 121 para ELISA. Os resultados sorológicos negativos foram incluídos no total de verdadeiros negativos. De acordo com a análise da **tabela 15**, observa-se que a proporção de resultados inconclusivos para o teste de ELISA foi significativamente superior ao da IFI ($p < 0,0005$) e ao da HAI ($p < 0,0001$).

5.4) Caracterização Sócio-demográfica dos 90 doadores convocados

Os 3 grupos de doadores convocados, cada um composto por 30 indivíduos (positivos, indeterminados e negativos) foram analisados quanto às principais características sócio-demográficas (**tabela 16**).

Tabela 16) Características sócio-demográficas dos 90 doadores convocados.

<u>VARIÁVEIS</u>	<u>GRUPOS DE DOADORES</u>			<u>VALOR-p (TESTE Z)</u>		
	POS	NEG	IND	Pos x Neg	Pos x Ind	Neg x Ind
SEXO						

Masculino	11 (37%)	18 (60%)	21 (70%)	p= 0,02	p= 0,001	p= 0,08
Feminino	19 (63%)	12 (40%)	9 (30%)	p= 0,04	p< 0,0005	p= 0,08
COR						
Branco	21 (70%)	24 (80%)	19 (63%)	p= 0,09	p= 0,12	p= 0,08
Não-brancos	9 (30%)	6 (20%)	11 (37%)	p= 0,078	0,093	p= 0,04
IDADE						
≤ 30 anos	1 (3%)	13 (43%)	15 (50%)	p< 0,0001	p< 0,0001	p= 0,09
> 30 anos	29 (97%)	17 (57%)	15 (50%)	p= 0,003	p= 0,001	p= 0,09
PROFISSÃO						
Qualificada / Semi-qualificada	16(53%)	24 (80%)	20 (67%)	p= 0,03	p= 0,07	p= 0,06
Não-qualificada	14 (47%)	6 (20%)	10 (33%)	p< 0,0005	p= 0,06	p= 0,07

As **figuras 16 a 19** representam as distribuições dos doadores positivos, negativos e indeterminados quanto à cor, sexo idade e profissão, respectivamente.

A

B

C

Figura 16) Distribuição dos doadores com sorologia positiva (A), negativa (B) e indeterminada (C) quanto à cor.

A

B

C

Figura 17) Distribuição dos doadores com sorologia positiva (A), negativa (B) e

A

≤ 30 anos

B

≤ 30

C

≤ 30 anos

Figura 18) Distribuição dos doadores com sorologia positiva (A), negativa (B) e

A

B

C

Figura 19) Distribuição dos doadores com sorologia positiva (A), negativa (B) e

A partir da análise da ficha epidemiológica de cada um dos 90 doadores convocados que compareceram ao HRU, foram retirados dados referentes à ocorrência de antecedentes para doença de Chagas (**tabela 17**) e foi calculado o Risco Relativo (RR) para cada antecedente. Observou-se que nos 3 grupos estudados, indivíduos que tiveram contato com o barbeiro e que têm familiares com a doença de Chagas, apresentam um risco (significativo) de respectivamente de 3,2 e 2,4 vezes a mais de adquirir a doença do que aqueles que não apresentam estes antecedentes. Não foi observada associação de risco entre doença de Chagas e transfusão de sangue (RR=1,3) e cirurgia/transplante (RR= 1,2). Entre aqueles que viveram ou vivem em regiões endêmicas observou-se risco de 3,3 vezes mais de adquirirem a doença. Contudo, este risco não foi significativo, devido ao fato de haver muitos indivíduos não doentes vivendo nestas regiões.

Tabela 17) Ocorrência de antecedentes para doença de Chagas entre os 90 doadores convocados.

GRUPOS DE DOADORES					
<i>ANTECEDENTES PARA</i>	<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>	<i>Indeterminados</i>	<i>(RR)</i>	<i>IC</i>

DOENÇA DE CHAGAS	N= 30	N=30	N=30		(95%)
Região endêmica	28(93%)	22 (73%)	23 (77%)	3,3 *	(0,86; 12,4)
Transfusão de sangue	3 (10%)	0 (0%)	4 (13%)	1,3	(0,53; 3,27)
Cirurgia / transplante	8 (27%)	5 (17%)	8 (27%)	1,2	(0,63; 2,3)
Contato com o barbeiro	21 (70%)	5 (15%)	12 (40%)	3,2 *	(1,65; 6,2)
				**	
Doença de Chagas na família	22 (73%)	11 (37%)	15 (50%)	2,4 *	(1,2; 4,8)
				**	

RR= Risco relativo estimado.

* Associação de risco

** Risco significativo

5.5) Cálculo da sensibilidade e especificidade dos testes realizados no Laboratório Central do HE / UFTM.

Para esta análise foram estudados apenas os doadores sabidamente positivos e os negativos, não sendo incluído o grupo indeterminado. Após a repetição dos três testes sorológicos para cada indivíduo, foi montada uma tabela de dupla entrada associando o resultado dos testes com a presença ou não da doença. As tabelas a seguir mostram estes cálculos para ELISA, IFI e HAI, respectivamente.

Tabela 18) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade do ELISA / HE

ELISA	DOENTES	NÃO-DOENTES	TOTAL
+	30	1	31
-	0	29	29

TOTAL	30	30	60
--------------	-----------	-----------	-----------

Sensibilidade (S) = 100%

Especificidade (E) = 97%

Tabela 19) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade da IFI / HE.

IFI	DOENTES	NÃO-DOENTES	TOTAL
+	30	0	30
-	0	30	30
TOTAL	30	30	60

Sensibilidade (S) = 100%

Especificidade (E) = 100%

Tabela 20) Tabela de dupla-entrada para cálculo da sensibilidade e especificidade da HAI / HE.

HAI	DOENTES	NÃO-DOENTES	TOTAL
+	30	0	30
-	0	30	30
TOTAL	30	30	60

Sensibilidade (S) = 100%

Especificidade (E) = 100%

A partir das análises das **tabelas 18, 19 e 20**, verifica-se que os três testes apresentaram sensibilidade de 100%, ou seja, conseguiram detectar a doença entre todos os portadores de

doença de Chagas. Quanto à especificidade, IFI e HAI obtiveram 100% e o ELISA demonstrou resultado falso-positivo em 1 indivíduo sadio, obtendo, portanto, especificidade de 96,6%.

Para o teste de hemocultura, foi calculada apenas a sensibilidade, já que não foi realizado este teste para o grupo controle (negativos) impossibilitando, portanto, o cálculo da especificidade da técnica. Dos 30 candidatos à doação com sorologia positiva, 12 (40%) foram positivos para hemocultura (*sensibilidade*= 40%) e entre os indeterminados, 100% foram negativos (**figura 20**).

Sensibilidade (S)= 40%

Figura 20) Resultado da hemocultura entre os 60 doadores não-negativos para doença de Chagas.

5.6- Análise geral dos resultados dos testes realizados para os doadores não-negativos e grupo controle

A **figura 21** está demonstrando o resultado dos testes sorológicos realizados, no Laboratório do Serviço de Patologia Clínica do HE-UFTM, para indivíduos indeterminados quanto à sorologia para doença de Chagas no HRU. Observa-se que dos 30 doadores indeterminados, 100% foram negativos na IFI e Hemocultura, e, 96,6% foram negativos para ELISA e HAI.

Dos 30 doadores excluídos por sorologia indeterminada para doença de Chagas no HRU, 28 (93%) foram negativos na repetição dos três exames sorológicos realizados no

laboratório do HE. Dos positivos, 100% foram repetidamente positivos e no grupo controle, 29 foram negativos (97%) e 1 indeterminado (3%) para o teste de ELISA (figura 22).

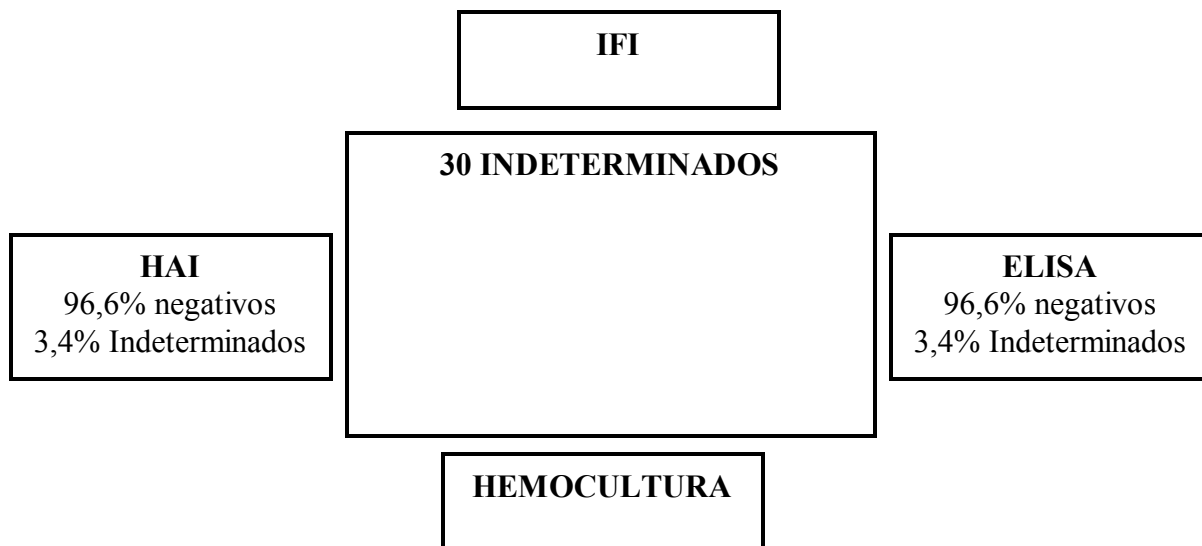


Figura 21) Resultado da repetição sorológica e do teste parasitológico dos 30 doadores indeterminados no HRU segundo sorologia do Laboratório de Patologia Clínica – Hospital Escola.

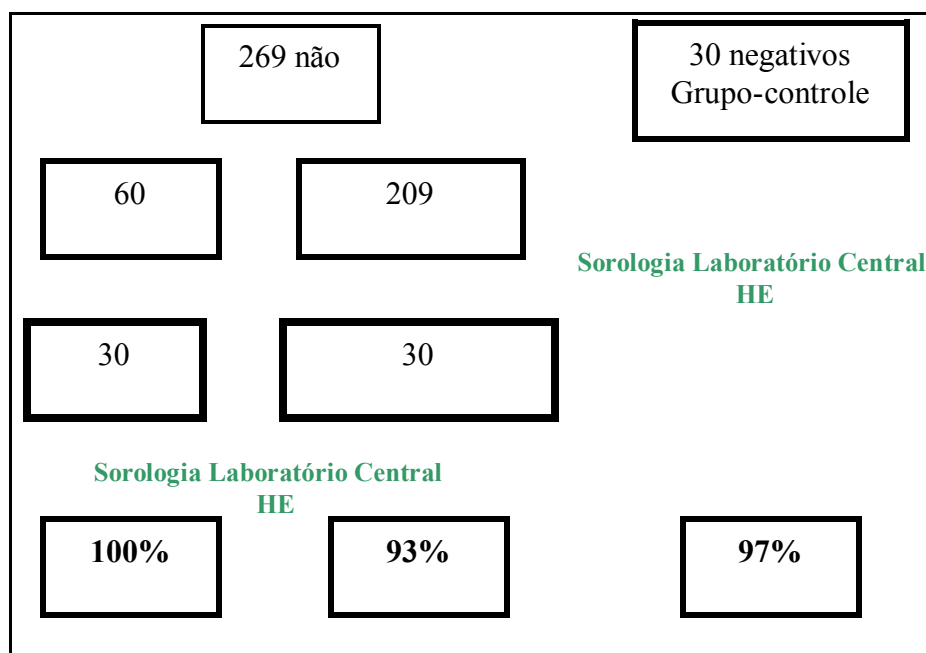


Figura 22) Análise geral dos resultados dos 90 doadores convocados.

Os resultados do ELISA foram analisados, ainda, quanto aos valores de *cut off*. Os 90 testes foram realizados em três corridas, nas quais os valores de *cut off* foram, respectivamente 0,294, 0,299 e 0,297, tendo portanto uma média (X) de 0,296. Os valores de *cut off* para cada indivíduo foram analisados quanto uma estatística descritiva (cálculos de média, mediana, mínimo e máximo) e através do método de *Dunn* para comparação entre as medianas de cada grupo. A **tabela 21** mostra estes resultados para os três grupos.

Tabela 21) Descrição dos valores de *Cut off* do teste de ELISA para os três grupos de doadores.

GRUPO	n	MIN.	MEDIAN	MAX.	CRUZAMENTO	VALOR-p
			A		S	(TESTE DE DUNN)
POSITIVO	30	0,987	2,000	2,760	POS x NEG	<0,0001
NEGATIVO	30	0,000	0,016	0,345	POS x INDET	<0,0001
INDETERMINAD	30	0,000	0,015	1,182	NEG x INDET	0,75

O

A partir da análise da tabela, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre a mediana dos grupos de doadores negativos e indeterminados ($p= 0,75$). Já a mediana ds positivos foi significativamente superior a dos grupos positivos e indeterminados ($p< 0,0001$).

A **figura 23** demonstra a comparação destes resultados entre os três grupos. De acordo com os limites superior e inferior, observa-se que 75% dos doadores positivos apresentaram *cut off* acima de 2,2 e 25% abaixo de 1,3. Os doadores negativos e indeterminados tiveram

comportamento semelhante, ou seja, 75% apresentaram *cut off* acima de 0,0 e 25% tiveram *cut off* igual a 0,0.

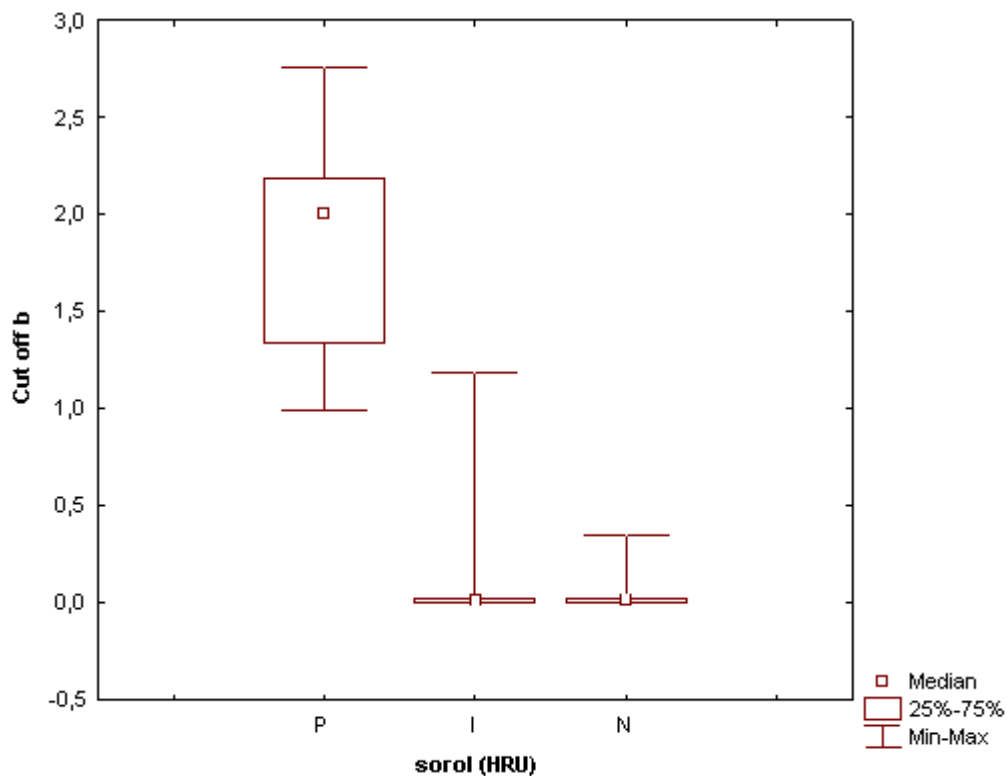


Figura 23) Análise do *cut off* (teste de ELISA) dos 90 doadores convocados.

6. DISCUSSÃO

1 Perfil sorológico e caracterização sócio-demográfica dos doadores não- negativos para doença de Chagas

No presente trabalho a ocorrência de sorologia não negativa para doença de Chagas entre doadores do Hemocentro Regional de Uberaba, no período de 2000 a 2005 foi

relativamente baixa (0,28%) quando comparada aos resultados de 1,1% encontrados por SILVA et al. (1999) e de 1,9% encontrados por SOBREIRA et al. (2001) em bancos de sangue do Ceará. Segundo dados da ANVISA (2002), no Brasil atualmente o descarte de bolsas de sangue por sorologia não negativa para *Trypanosoma cruzi* é de 0,6%.

O baixo índice de indivíduos não negativos nesse estudo pode ser explicado pelo controle eficaz do vetor em nossa região, considerada endêmica até a década de 80, e também pelo número de doadores fidelizados (de retorno) do Hemocentro Regional de Uberaba, que no período estudado corresponderam à grande maioria (82%).

O perfil sorológico dos 269 doadores não-negativos evidencia uma discreta predominância de reações indeterminadas (52%) sobre aquelas verdadeiramente positivas (48%). Diferentes estudos têm demonstrado que reações indeterminadas podem representar, freqüentemente, mais de 50% das inaptidões sorológicas para doença de Chagas em bancos de sangue e não raramente, são superiores a 80% (XVI REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS; MORAES-SOUZA et al., 2006)

Nesse estudo a prevalência de doações do sexo feminino (27%) foi semelhante aos dados nacionais fornecidos pela ANVISA (2003) demonstrando que a doação feminina correspondeu a apenas 26% das doações no Brasil e foi superior ao percentual de 8% encontrado pelo HEMOPA (1995). Essa diferença, segundo GUARIENTO et al., 1996, pode ser explicada culturalmente pelo fato de que se atribui ao sexo masculino o papel de bons doadores de sangue.

Apesar do pequeno predomínio de sorologia não-negativa ter-se mostrado semelhante em ambos os sexos (0,32% para mulheres e 0,26% para homens), a proporção de

soropositividade (verdadeiros positivos) foi significativamente superior entre as mulheres (0,2% versus 0,1%). Segundo a FNS (1994) não há relação entre o sexo e a infecção chagásica, sendo que esta acomete indistintamente homens e mulheres.

A distribuição dos doadores em grupos com idade inferior ou igual a 30 anos e maiores que 30 anos foi estabelecida de acordo com o período de criação de legislações específicas para doação de sangue, que ocorreu entre os anos 70 e 80 (DIAS & SCHOFIELD, 1998) e o início dos programas de controle nacional do vetor da doença de Chagas. Apesar do pequeno predomínio de doadores com idade superior a 30 anos (52%), 81% dos soropositivos se concentraram nesta faixa etária ($p < 0,0001$). Entre aqueles com sorologia indeterminada, não foi evidenciada diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,078$).

O estudo por diferentes faixas etárias revelou correlação linear forte diretamente proporcional entre o aumento da idade e o índice de soropositividade, com pico entre 41 e 50 anos (28,4%). Estes resultados são condizentes com os encontrados por SOBREIRA et al., 2001, que encontraram maior prevalência de doadores soropositivos dentro desta mesma faixa etária. Similarmente, WENDEL (1997) mostrou correlação positiva entre idade e sorologia positiva para doadores da América Latina

Quanto aos resultados indeterminados, bastante comum nos hemocentros do Brasil e América Latina, torna-se necessário os estudos mais detalhados destes indivíduos, que na maioria das vezes são pessoas jovens (segundo nosso estudo a maioria se encontrou na faixa etária entre 20 e 30 anos) e saudáveis, que acabam sendo rotulados como chagásicos.

A análise dos doadores não-negativos para doença de Chagas, em nosso serviço, quanto às características sócio-demográficas, indicou que a grande maioria foram doadores brancos,

do sexo masculino e maiores de 30 anos, exercendo profissões semi-qualificadas e procedentes de regiões endêmicas ou rurais. Nosso estudo diferiu, quanto à cor e profissão, de outros serviços de hemoterapia do Brasil (HEMOPA, 1995; HEMOSC, 1998), que encontraram maioria de pardos entre doadores não-negativos para doença de Chagas e exercendo profissões não-qualificadas.

Quanto à procedência, foi analisado o local de nascimento de cada doador. Observou-se que 96% dos doadores positivos e 85% dos indeterminados nasceram em regiões endêmicas, vivendo nestas áreas pelo menos até a primeira década de vida. Estas proporções são condizentes com a localização do Hemocentro Regional de Uberaba em região considerada altamente endêmica para doença de Chagas até final da década de 80 (PRATA, 2001), sendo que a maioria das doações recebidas são de indivíduos provenientes desta região.

6.2 Análise dos testes sorológicos utilizados na triagem sorológica para doença de Chagas no HRU

A análise de concordâncias, calculada através do índice *Kappa*, mostrou que os testes de ELISA e HAI, quando realizados em conjunto, apresentaram uma concordância considerada boa (0,66), seguidos pelos índices de ELISA x IFI (0,6) e IFI x HAI (0,5). Estudo realizado por HAMERSCHLAK, et al., 1997, demonstrou concordância fraca entre HAI e IFI ($K=0,26$). De modo geral os resultados concordantes por nós encontrados, foram superior ao encontrado por CAMARGO et al. (1986), num amplo estudo para normalização do diagnóstico sorológico para doença de Chagas, em que obteve índices de concordância tão baixos quanto 0,56 (MORAES-SOUZA, 2000).

Nosso estudo demonstrou sensibilidade de 97,9%, 99% e 99,2% para HAI, IFI e ELISA, respectivamente e especificidade de 99,9% para HAI e IFI e 99,8% para o ELISA. Para o cálculo destes coeficientes estimou-se que os 140 doadores com sorologia indeterminada eram falso-positivos. Foi considerado um resultado falso-negativo referente a um único doador de retorno que apresentou sorologia positiva. Como não se pôde analisar se este resultado ocorreu devido a falhas na sensibilidade dos testes empregados em doações prévias, ou se houve contaminação pelo *T. cruzi* entre a penúltima e a última doação deste indivíduo, consideramos a primeira opção, levando-se em conta a data de doação deste indivíduo (que até o início de 2001 foi repetidamente negativo em todos os testes, positivando no segundo semestre do mesmo ano).

Nosso estudo demonstrou que 96% das doações recebida pelo HRU, nos últimos seis anos, foram triadas pela técnica de ELISA. O índice de adesão ao teste, que até no final da década de 80 era de 14,3% nos bancos de sangue do estado de São Paulo, passou para 60,2%

no início da década de 90 (MORAES-SOUZA, 1994; ALMEIDA, 1997), sendo hoje a técnica recomendada pela legislação vigente (ANVISA, 2004 – Portaria 153).

Entre os 140 doadores com sorologia indeterminada, o maior índice de resultados inconclusivos entre os testes, foi do ELISA (54%). Contudo a especificidade deste teste (99,8%) não diferiu de forma discrepante dos coeficientes de especificidade das técnicas de HAI e IFI (99,9% para ambos), o que pode ser explicado pelo fato de que proporcionalmente um maior número de doadores foram triados pela técnica de ELISA ao longo dos últimos seis anos, encontrando-se altas taxas de verdadeiros negativos.

A ocorrência de reações indeterminadas entre os três testes pode ser explicada pela diferenciação na padronização da técnica em bancos de sangue em relação aos laboratórios clínicos.

O ELISA tem a área de indeterminação correspondente ao dobro dos laboratórios clínicos. Esse aumento visa melhorar a sensibilidade do teste, protegendo ao máximo o receptor contra infecções hemotransmissíveis e é utilizada pela grande maioria dos hemocentros. Com isto, o índice de inaptidão sorológica tende a aumentar, uma vez que a especificidade do teste torna-se inversamente proporcional em casos de aumento da sensibilidade (FERREIRA, 2001).

Para a Imunofluorescência Indireta observamos 25% de resultados inconclusivos. Segundo AMATO NETO, 2002, o processamento da técnica em diluições do soro em nível de 1:20 está vinculado a falsas positivities. Segundo o autor a falta de confiabilidade da técnica neste nível de diluição, está diretamente vinculado ao índice de exclusão de doadores falso-positivos, pois nesta diluição o soro do paciente está concentrado, o que facilita a

ocorrência de reações com anticorpos inespecíficos. Contudo, valoriza-se a alta sensibilidade da técnica nesta diluição. Exames realizados pelo mesmo autor em 100 indivíduos infectados por *T. cruzi* e co-infectados por HIV mostraram sensibilidade de 100% para o método. Estudos de SÁEZ-ALQUÉZAR (1998), em 57 dos maiores bancos de sangue do Brasil, mostram a sensibilidade da IFI variando de 98,1% a 100%.

6.3 Caracterização Sócio-demográfica dos 90 doadores convocados

A análise das características sócio-demográficas dos três grupos de doadores convocados (positivos, indeterminados e negativos) demonstrou diferença significativa entre: positivos x negativos e positivos x indeterminados, respectivamente, quanto ao sexo e idade e entre os positivos x negativos quanto à profissão. Já a análise do comportamento entre os negativos e indeterminados não indica diferenças significativas quanto às variáveis: sexo, idade e profissão. Quanto à cor, houve maioria de não-brancos entre os indeterminados em relação aos negativos ($p=0,04$). Estes dados evidenciam a similaridade entre o perfil social dos negativos e dos indeterminados, podendo ser um indício de que doadores indeterminados são na verdade indivíduos sadios que tiveram resultados falso-positivos nos testes realizados.

6.4 Sensibilidade e especificidade dos testes realizados

Para o cálculo da sensibilidade e da especificidade das técnicas, foram analisados os 30 doadores positivos e os 30 negativos (grupo controle) convocados para a repetição dos testes sorológicos. A sensibilidade das três técnicas foi de 100% e a especificidade foi de 96,6% para o ELISA e de 100% para IFI e HAI . Estes resultados são condizentes com vários estudos brasileiros que demonstram a sensibilidade média das técnicas sorológicas igual a 99% e especificidade de 98% (MORAES-SOUZA, 2000; UMEZAWA, 2004; MORAES-SOUZA et al., 2006).

Considerando que os 140 doadores com sorologia indeterminada no HRU, são doadores falso-positivos, ou seja, não apresentam a doença, a sensibilidade dos testes de ELISA, IFI e HAI, foram, respectivamente: 99,2%, 99% e 97,9% e a especificidade 99,8%, 99,9% e 99,7%. Observa-se, portanto, que estes coeficientes estão dentro da média encontrada em outros serviços de hemoterapia do Brasil (SÁEZ-ALQUÉZAR et al.,1997; LANGHI-JÚNIOR, et al., 2002) e são superiores aos encontrados em bancos de sangue da Bolívia, cuja sensibilidade média foi de 90% para HAI e 97% para ELISA (PIRARD, et al., 2005).

O teste de Hemocultura teve uma sensibilidade de 40% (12 dos 30 positivos), e entre os indeterminados não foi encontrado nenhum resultado positivo. Vários estudos mostram diferentes índices de sensibilidade para a técnica. Estudo realizado por CHIARI, et al., 1989,

em 40 pacientes chagásicos crônicos demonstrou sensibilidade de 55%, utilizando 30ml de sangue coletados em tubos com anticoagulante, retirando-se rapidamente o plasma e adicionando ao sedimento de hemácias o meio LIT, a 4⁰C. Outros trabalhos revelam sensibilidade da técnica variando de 36,5% (MORA, 1996) a 40% (GOMES, et al., 1999).

Estudo realizado por LAGES-SILVA, et al.(2001), em 52 pacientes chagásicos com a forma digestiva da doença (portadores de megaesôfago), demonstrou uma sensibilidade de 73,1% para o método de hemocultura. A autora relaciona maior parasitemia às formas tissulares da doença, sendo que os maiores índices de positividade são encontrados na forma digestiva, seguidos pelas formas cardíacas e cárdio-digestivas. Nos portadores da forma indeterminada, a parasitemia é mais baixa, havendo, portanto, baixo coeficiente de sensibilidade para a técnica. Nosso estudo confirma os dados encontrados pela autora, sendo que dos 12 pacientes que tiveram positividade para hemocultura, 75% (8) são portadores de formas tissulares da doença (megaesôfago-3, megacólon-2, cardíaca-3), de acordo com análise dos prontuários destes pacientes no HE. A baixa sensibilidade para Hemocultura pode ainda, ser explicada pelo fato de que a totalidade dos doadores atendidos já se encontravam na fase crônica tardia da doença, onde os níveis de parasitemia são freqüentemente baixos.

6.5. Análise geral dos resultados dos não-negativos e do grupo-controle

A repetição dos testes sorológicos dos 30 doadores com sorologia indeterminada no HRU, pelas três técnicas sorológicas (ELISA, IFI e HAI), revelou que 93% desses indivíduos

(28) foram repetidamente negativos para as três técnicas, um permaneceu indeterminado para a técnica de HAI e outro foi positivo para ELISA.

Estes resultados sugerem fortemente que a grande maioria (senão a totalidade) dos doadores com sorologia indeterminada não possuem a doença, o que é reforçado pela análise dos valores do *cut off* do teste de ELISA para esse grupo de doadores. A mediana do *cut off* entre os indeterminados foi equivalente à dos negativos e, apenas a variação dos indeterminados foi um pouco mais ampla. Esta maior variação ocorreu devido ao fato de que um dos indeterminados apresentou resultado positivo no teste de ELISA, com *cut off* de 1,182.

O expressivo índice de indeterminação encontrado nos testes do HRU, pode ser explicado pela padronização das técnicas utilizadas na triagem sorológica dos doadores, que são realizadas em menores diluições do soro, ou em níveis de leitura que ampliam a área cinza do teste de ELISA. Estes procedimentos por parte dos hemocentros visam proteger ao máximo o receptor de sangue, evitando a ocorrência de doenças hemotransmissíveis. Contudo, anualmente podem ser perdidos centenas de doadores hígidos, que poderiam estar contribuindo de forma importantíssima com a população.

A sorologia assume um papel relevante na triagem dos candidatos à doação de sangue, pois é o procedimento que, ao final do processo, determina ou não a utilização do sangue e componentes, além de identificar infecções em indivíduos que até então eram considerados sadios.

O diagnóstico sorológico da doença de Chagas é complexo, por produzir tanto resultados falso-positivos quanto falso-negativos (CHIARI 1992). As reações cruzadas, a

sensibilidade e a especificidade das técnicas e a padronização dos reagentes, ainda são problemas a serem solucionados, fazendo-se necessário que sejam desenvolvidas técnicas de baixo custo, de fácil execução, com boa reprodutibilidade e que tenham, idealmente, sensibilidade e especificidade de 100% (LUQUETTI, 1990; MORAES-SOUZA et al., 2006).

Diante da premissa de que não há testes sorológicos que possam ser considerados padrão-ouro para o diagnóstico da doença de Chagas (LUQUETTI, 2000; LANGHI-JUNIOR et al., 2002), pode-se afirmar que não existe transfusão de sangue isenta de risco, devido à possibilidade de resultados falso-negativos e, que sempre ocorrerá a possibilidade de falso-positivos, com conseqüente descarte de sangue sadio, acarretando custos para o SUS, comprometimento do suprimento de sangue nos hemocentros, além de trazer conseqüências de ordem psicológica e social ao doador inapto, que passa a acreditar ser portador de uma doença crônica, associada a comprometimentos que podem, inclusive, levar à morte súbita, sem contar os gastos médico-hospitalares para estes indivíduos até o completo esclarecimento de seu estado de saúde.

Diante destas questões, vários autores têm estudado a implementação de testes confirmatórios na rotina de bancos de sangue, visando definir com 100% de segurança o exato perfil sorológico dos doadores de sangue. Assim, métodos confirmatórios, principalmente na área de biologia molecular, vêm aos poucos sendo preconizados (MORAES-SOUZA, 2000). Estudos envolvendo o Western blot revelou-se pouco específico, favorecendo as reações cruzadas com soro de pacientes portadores de outras infecções. A PCR, apesar de alta sensibilidade e teoricamente capaz de detectar a presença do parasita em pequenas quantidades

de sangue, foi repetidamente negativo em amostra sabidamente positivas através do xenodiagnóstico (MORAES-SOUZA & BORDIN, 1996).

Em estudo realizado por SILVEIRA-LACERDA, et al., 2004, sobre o comportamento do TESA-blot, pesquisou-se 348 soros de doadores do Hemocentro de Uberlândia com sorologia indeterminada para doença de Chagas, observando-se que 97% foram negativos para o teste. Entre os positivos houve 100% de sensibilidade e entre os negativos, 100% de especificidade.

Para a análise da ocorrência de reações cruzadas entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp.*, AMATO NETO et al., 2005, comparou o resultado dos três testes sorológicos com o TESA-blot. Para isto, o autor estudou quatro grupos de indivíduos com sorologia positiva, negativa e indeterminada para doença de Chagas e um composto por indivíduos sabidamente portadores de leishmaniose visceral. Observou-se que o TESA-blot foi 100% sensível e específico e, entre os indeterminados, o teste foi negativo para 80% dos indivíduos deste grupo. A ocorrência de reações cruzadas, entre os testes sorológicos variou de 73,3% para HAI e ELISA a 90% para IFI, já para o TESA-blot, este índice foi de 6,6%. O autor concluiu que esses resultados são bastante expressivos, mas ainda requer investigações mais detalhadas, em populações maiores, a fim de evitar interpretações errôneas.

De maneira geral, a utilização dos testes sorológicos em bancos de sangue mostra-se imprescindível e não deve ser extinta da triagem dos doadores de sangue. Contudo, atualmente a meta principal dos hemocentros é a busca por métodos laboratoriais alternativos, de baixo custo e alta reprodutibilidade, que possam ser utilizados em associação com testes sorológicos,

compensando as possíveis falhas destes testes, podendo assim, se firmar como método confirmatório na triagem de doadores de sangue.

7. CONCLUSÕES

1. A ocorrência de não-negativos nos testes de triagem sorológica para doença de Chagas, no HRU nos últimos seis anos (0,28%), foi inferior a de vários bancos de sangue do Brasil, devido ao grande número de doadores de retorno neste Serviço.
2. A maioria dos doadores não-negativos foram indivíduos brancos, provenientes de regiões endêmicas para doença de Chagas, exercendo profissões semiqualificadas e do

sexo masculino, apesar da prevalência de soropositividade ter sido significativamente superior entre as mulheres.

3. Na triagem sorológica, o teste de ELISA foi o mais utilizado (96%) e o que apresentou os maiores índices de resultados inconclusivos (54%), o que pode ser explicado pelo alargamento da área de indeterminação para a leitura deste teste em bancos de sangue.
4. O conjunto de testes que apresentou melhor concordância foi ELISA x HAI ($Kappa=0,66$), seguido de ELISA x IFI ($Kappa = 0,6$) e IFI x HAI ($Kappa = 0,5$).
5. A repetição das três técnicas sorológicas (ELISA, HAI e IFI) entre os doadores não-negativos, no Laboratório Central do HE/UFTM, definiu com 100% de sensibilidade a infecção chagásica entre os inaptos por sorologia positiva no HRU. Já o teste parasitológico (Hemocultura) teve uma sensibilidade de 40% (sendo concordante com outros estudos), o que pode explicado pela baixíssima parasitemia dos doadores, que já se encontravam na fase crônica da doença.
6. A especificidade das técnicas de IFI e HAI foi de 100%. O ELISA revelou um resultado indeterminado entre os 30 doadores do grupo controle (negativos), apresentando, portanto, especificidade de 96,6%.

7. Para doadores com sorologia indeterminada no HRU, a repetição dos três testes sorológicos e um parasitológico revelou negatividade em 28 dos 30 indivíduos (93%). Observou-se que apenas um permaneceu indeterminado para HAI e um positivo para o ELISA.
8. As dificuldades na abordagem e condução de doadores com reações indeterminadas, a quase totalidade não-chagásica, e o expressivo descarte de bolsas de sangue, tornam evidente a necessidade de implementação de estratégias que permitam minimizar, ou mesmo eliminar os resultados sorológicos duvidosos ou indeterminados.
9. Estas estratégias, que permitam detectar com maior segurança a infecção chagásica e definir com maior exatidão o perfil sorológico de doadores indeterminados, devem consistir no desenvolvimento de testes 100% sensíveis e específicos, além da implementação de exames confirmatórios práticos, rápidos e automatizáveis, passíveis de serem introduzidos na rotina de bancos de sangue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, I.C.; COVAS, D.T., et al. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*. V.37: 850-857, 1997.
2. AMATO NETO, V.; DE MARCHI, C.R.; FERREIRA, C.S.; FERREIRA, A.W. Observações sobre o TESA blot no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* V.38(6): 176-178, 2005.

3. AMATO NETO, V.; DE MARCHI, C.R.; ROSSITO, S.T.; NASCIMENTO, M.S. Avaliação da sensibilidade da diluição 1/20 pela reação de Imunofluorescência Indireta, no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** V.35(2): 195-196, 2002.
4. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de produção hemoterápica do estado de Minas Gerais de 2000 a 2002. Divulgado em 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/sangue/hemoterapia/relatórios-produção/resumo-MG.ppt>. Acesso em 05/03/2006.
5. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 343 de 13 de dezembro de 2002. Relatório de Produção da Hemorede em 2002: perfil sorológico dos doadores. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br> - acesso em 10 mar. 2004.
6. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004. Publicada no Diário Oficial da união de 24 de junho de 2004. disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=11662>. Acesso em 12/04/2006.
7. ARANGO, H.G. Bioestatística: teórica e computacional. 2ª edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 2005.
8. BOYDEN, S.V. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. **J. Exp. Med.** V.93: 107-120, 1951.
9. BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS, C.P.; COURA, R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. **FIOCRUZ**. p. 23-31, Rio de Janeiro, 1997.
10. CAMARGO M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista Inst. Med. Trop.** V.8(5): 227-234, 1966
11. CAMARGO, M.E.; SEGURA, E.L. et al. Collaboration on the standardization of Chagas' disease serodiagnosis in the americas. **Bull Pan Am Health Organ.** V.20: 233-244, 1986.
12. CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana: Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. gen., n. sp., agente etiológico de

- nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. V.1: 159-218, 1909.
13. CHAPADEIRO, E. Clinical evolution morbo-mortality in Chagas' disease. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. V.94 (1): 309-310, 1999.
 14. CHIARI, E; DIAS, J.C.P.; LANA, M.; CHIARI, C.A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. V. 22: 19-23, 1989.
 15. CHIARI, E. diagnostic test for Chagas' disease. In: WENDEL, S; BRENER, Z; CAMARGO, M.E.; RASSI, A. Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo: ISTB BRAZIL. p. 153-164, 1992.
 16. CHIARI, E; BRENER, Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na fase crônica. *Rev. Inst. Med. Trop*. V.8: 134-138, 1966.
 17. CHIARI, E; DIAS, J.C.P.; LANA, M.; CHIARI, C.A.: Hemocultures for the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in the chronic phase. *Long Intern*. Sobre doença de Chagas. Rio de Janeiro, 1979.
 18. CORREA, A.D.; MIRANDA FILHO, N. A Propósito das vias de transmissão da moléstia de Chagas. *JBM*. V.69(4): 150-154, 1995.
 19. DIAS, J. C. P. Mecanismos de transmissão. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z. O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. Cap.4, p.152-174, 1979.
 20. DIAS, J. C. P. Epidemiology of Chagas disease. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A. Chagas' disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo: ISBT. BRAZIL.1992 . p.49-80.
 21. DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: Epidemiologia e Prevenção. *Arq. Brás. Cardiol*. V.63(5): 450-455, 1994.
 22. DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America – A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, V. 97(5): 603-612, 2002.
 23. DIAS, J.C.P. Control of Chagas Disease in Brazil. *Parasitol Today*. V.3: 336-341, 1987.

24. DIAS, J.C.P.; SCHOFIELD, C.J. Controle da Transmissão Transfusional da Doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V.31(4): 373-383, 1998.
25. FERREIRA, A.W.; BELEM, Z.R.; LEMOS, E.A., et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* V.30: 4390-5, 2001.
26. FIGUEIRÊDO, S.S.; CARVALHO, N.C.; NÓBREGA, B.B, et al. Caracterização radiográfica das manifestações esofagogastrintestinais da doença de Chagas. *Radiol. Bras.* V.35(5): 293-297, 2002.
27. FLEISS, A.R. Clinical epidemiology. In: the architecture of clinical research. Philadelphia, saunders, p. 185-186, 1985.
28. FNS. Fundação Nacional de Saúde. Inquérito epidemiológico para avaliação do programa de controle da doença de Chagas. Brasília, DF. Manual técnico, 1994.
29. FREITAS, C.A. Alguns aspectos da epidemiologia e profilaxia da doença de Chagas no Brasil. *Rev. Bras. Malariol. Doença Tropical*. Brasília. V.22/27:61-92, 1974/1975.
30. GALVÃO, L.M.C. Contribuição ao critério de cura da doença de Chagas humana. (tese de doutorado). Depto de Parasitologia, Belo Horizonte, UFMG, 1990.
31. GOMES, M.L.; GALVÃO, L.M.C.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J. Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. *Am. J. Trop Med. Hyg.* V.60: 205-10, 1999.
32. GONTIJO E. D. Doença de Chagas Transfusional na Região Metropolitana de Belo Horizonte/MG: aspectos clínicos-epidemiológicos e a questão institucional. Tese de doutorado.UFMG.Belo Horizonte. 1989.
33. GONTIJO, E.D. Triagem sorológica da doença de Chagas em unidades hemoterápicas: minimizando o sofrimento desnecessário e o desperdício de sangue dos falso-positivos e garantindo um sangue seguro. *Rev.Bras. Med. Trop.* V.33: 92-93, 2000.
34. GUARIENTO, M.E.; ALMEIDA, E.A.; GILLI, S.C. Perfil do Doador de Sangue Infectado Pelo *T. cruzi* em Campinas, SP: avaliando a partir de seu

grau de risco para a enfermidade. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V. 2(2): 27-29, 1996.

35. HAMERSCHLAK, N; PASTERNAK, J.; AMATO NETO, V. et al. Chagas' disease: an algorithm for donor screening and positive donor counseling. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* V.30(3): 205-209, 1997.
36. HEMOPA. Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Pará. Belém. 1995. Ano III n.8 Informativo – Jornal do HEMOPA.
37. HEMOSC. Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina. Florianópolis. 1998. ANO V, n. 113. Informativo - Jornal do HEMOSC.
38. HIGUCHI, M.L. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* V. 4(1): 263-277, 1999.
39. IBGE – Informativo. Sinopse preliminar do senso demográfico – Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 1991.
40. KIRCHOFF, L.V. American trypanosomiasis (Chagas' disease). A tropical disease now in the United States. *New England Journal of Medicine*. V.329: 639-644, 1993.
41. LAGES-SILVA, E; CREMA, E.; RAMÍREZ, L.E.; CHIARI, E., et al. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* V.65 (5): 435-441, 2001.
42. LANGHI JUNIOR, D.M.; BORDIN, J.O.; CASTELO, A.; MORAES-SOUZA, H.; STUMPF, R.J. The application of Latent Class Analysis for Diagnostic Test Validation of Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection in Blood Donors. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. V.6(4): 181-187, 2002.
43. LIMA, A.O. Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação. 8ª edição, 2001. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.
44. LUQUETTI, A.O. Use of *Trypanosoma cruzi* defined proteins for diagnosis Multicentretrial. Serological and Technical Aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. V.85(4): 497-505, 1990.
45. LUQUETTI A. O. Diagnóstico da doença de Chagas. *Revista Pat. Trop.* V.29: 145-149, 2000.

46. MAZZA, S.; MONTANA, A.; BENITEZ, C.; & JANZI, E, Z. Transmission del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre com enfermedad de Chagas. *MEPRA*. V.28: 41-6, 1936.
47. MIDDLEBROOK, G.; DUBOS, R.J. Specific Serum Agglutination of Erythrocytes Sensitized with Extrats of Tubercle Bacilli. *J. Exp. Med.* V.8: 521-528, 1948.
48. MINISTÉRIO DA SAÚDE PORTARIA Nº 1.376: Normas Técnicas para Coleta, Processamento e Transfusão de Sangue. Diário Oficial da União, Brasil, 1993.
49. MONCAYO, A. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends After the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* V. 98(5): 577-591, 2003.
50. MORA M.X.C. Avaliação de uma técnica modificada de hemocultura para *T. cruzi*, na forma crônica da doença de Chagas em uma área endêmica. *Rev. Soc. Med. Trop.* V.29: 515-6, 1996.
51. MORAES-SOUZA, H; MORAIS, C.A; MINEO, JR. Prevalência da Infecção Chagásica em Candidatos a Doadores de Sangue no Triângulo Mineiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V.118: 11-16, 1985.
52. MORAES-SOUZA, H. Mecanismos alternativos de transmissão parenteral da doença de Chagas. *Revista Médica de Minas Gerais*. V.3(2): 93-95, 1993.
53. MORAES-SOUZA, H.; WANDERLEY, D.N.V.; BRENER, S.; NASCIMENTO R.D.; ANTUNES C.M.F.; DIAS J.C.P. Hemoterapia e doença de Chagas transfusional no Brasil. *Bol Oficina Sanit Panam*. V.116: 406-18, 1994.
54. MORAES-SOUZA, H.; BORDIN, J.O. Strategies for prevention of transfusion-associated Chagas' disease. *Transfusions Medicine Reviews*. V.10: 161-170, 1996.
55. MORAES-SOUZA, H.; RAMÍREZ, L.E.; BORDIN, J.O. Doença de Chagas Transfusional: Medidas de Controle. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. FIOCRUZ, Rio de Janeiro. P.429-443, 1997.
56. MORAES-SOUZA, H. Transmissão Transfusional da Doença de Chagas. *Revista de Patologia Tropical*. V.29(91): 91-100, 2000.

57. MORAES-SOUZA, H.; GONTIJO, E.D.; MORENO, A.H.; DUARTE, A.N.; BONAMETTI, A.M. et al. Atenção médica a candidatos a doadores de sangue em centros urbanos: inserção no Sistema de Saúde (Provas sorológicas positivas e inconclusivas para a doença de Chagas). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V.33: 111- 115, 2000.
58. MORAES-SOUZA, H.; MARTINS, P.R.J.; FERREIRA-SILVA, M.M., et al. Perfil sorológico para doença de Chagas dos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberaba. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* V.28(2): 105-109, 2006.
59. OPAS. Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos de controle de calidad para los laboratorios de sorologia de los bancos de sangre. Washington, documento técnico. PAHO/HPC/HCT 94.21, 1994.
60. OPAS. Organización Panamericana de la Salud. Medicina transfusional en America Latina 1994-2002. Document OPS/ EV – LAB/01.2003. Washington, 2003.
61. OPAS. Organização Panamericana de Saúde. Informativo junho / 2006. Brasil elimina transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*. Disponível em [http:// www.opas.gov.br](http://www.opas.gov.br). Acesso em 23/ 09/2006.
62. PEDREIRA DE FREITAS, J.L; AMATO NETO, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; NUSSENZWEIH, V. & BARRETO, J.G. Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. *Rev. Paul Med.* V.40: 36-40, 1952.
63. PELEGRINNO, J. Transmissão da doença de chagas pela transfusão de sangue. Primeiras comprovações sorológicas em doadores e em candidatos a doadores de sangue. *Rev. Bras. Med.* V.6: 297-301, 1949.
64. PIRARD, M.; IIOSHI, N.; STUYFT, P.V., et al. The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region. *Transfusion*. V.45: 554-561, 2005.
65. PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. The Lancet. *Infectious Diseases*. V.1: 92-100, 2001.
66. REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSES (XVI). Relatório Final – Uberaba - MG, 2000. 3p.
67. SÁEZ-ALQUEZAR, A.; LUQUETTI, A.O.; BORGES-PEREIRA, E.M., et al. Estudo multicêntrico: avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos

de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil, para o diagnóstico sorológico da infecção chagásica pelo *T. cruzi*. *Rev. Patol. Trop.* V.26: 343-374, 1997.

68. SÁEZ-ALQUEZAR, A.; OTANI, M.M.; SABINO, C.C. et al. Evaluation of the performance of brazilian blood banks in testing for Chagas' disease. *Vox Sanguinis*. V.74: 228-231, 1998.
69. SALLES, N.A.; SABINO, E.C.; CLIQUET, M.G.; ELUF-NETO, J.; MAYER, A.; ALMEIDA-NETO, C.; MENDONÇA, M.C.; DORLIACH-LLACER, P.; CHAMONE, D.F.; SAEZ-ALQUEZAR, A. Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors. *Transfusion*. V. 36(11-12): 969-73, 1996.
70. SANDLER, S.G. Chagas' disease. American Red Cross Blood services *Letters*. V.89: 1-10, 1989.
71. SCHMUNIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*: the etiologic agent of Chagas' disease: STATUS in the blood supply um endemic and nonendemic countries. *Transfusion*. V.31(6): 547-557, 1991.
72. SCHMUNIS, G.A. Tripanosomíase Americana: seu impacto nas Americas e perspectivas de eliminação. In DIAS J.C.P., COURA J.R., Clínica e terapêutica da doença de Chagas. FIOCRUZ. Rio de Janeiro. P.11-23, 1997.
73. SCHMUNIS, G.A.; ZICKER, F.; DEL POZO, A.; SEGURA, E. Blood transmitted infections diseases in Argentina, 1995 trough 1997. *Transfusion*. V.40: 1048-53, 2000.
74. SCHOFIELD, C.J.; DIAS, J.C.P. A cost benefit analysis of Chagas disease control. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. V.86: 285-295, 1991.
75. SCHOFIELD, C.J.; DIAS, J.C.P. The southern cone initiative against Chagas' disease. *Adv. Parasitol.* V.42: 1-27, 1999.
76. SILVA, V.C.; FIGUEIREDO, A.A.; QUEIROZ, J.A.N.; ANDRADE, F.B. Análise da Prevalência de anticorpos anti -*T. cruzi* em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). In: Resumos do XVII Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa, Fortaleza 1999; p.368.
77. SILVEIRA, A.C.; FEITOSA, V.R. Distribuição dos triatomíneos capturados no ambiente domiciliar no período de 1975-1983, Brasil. *Rev. Bras. Malariol. Doença Trop*, Brasília. V.36: 15-312, 1984.

78. SILVEIRA-LACERDA, E.P.; SILVA, A.G.; UMEZAWA, E.S., et al. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a brazilian blood bank. *Vox Sanguinis*. V.87: 204-207, 2004.
79. SOBREIRA, A.C.M.; GOMES, F.V.B; SILVA, M.A.M.; OLIVEIRA, M.F. Prevalência da Infecção Chagásica em Doadores de Sangue do Hemocentro Regional de Iguatu, CE. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* V.34(2): 193-196, 2001.
80. STRAVITSKY, A.B. Micromethods for the study of proteins and antibodies. Procedure and general application of hemagglutination and hemagglutination Inhibition reactions with tannic acid and protein treated red blood cells. *J. Immun.* V.73: 360-367, 1954.
81. UMEZAWA, E.S.; CORBETT, C.E.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. STOLF, A.M. Chagas' disease. *Lancet*. V.357: 797-799, 2001.
82. UMEZAWA, E.S.; LUQUETTI, A.O.; PONCE, C., et al. Serodiagnosis of Chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J. Clin. Microbiol.* V.42(1): 449- 452, 2004.
83. VOLLER, A.; DRAPER, C.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. *Lancet*. V.1: 426-428, 1975.
84. WENDEL, S.; DIAS, J.C.P. Transfusion transmits Chagas' disease. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A.: Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact in transfusion and clinical medicine. São Paulo: ISBT. Brazil. p. 103-133, 1992.
85. WENDEL, S. Doença de Chagas Transfusional. In: Dias, J.C.P; COURA, J.R. (Org) Clínica e Terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral, Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, p.411-427, 1997.