

## ARTIGOS

# ANTÍGENOS SOLÚVEIS LIBERADOS POR TRIPOMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* UTILIZADOS NO TESTE DE ELISA PARA DETECTAR CURA EM PACIENTES CHAGÁSICOS APÓS TRATAMENTO ESPECÍFICO

Greice M. Krautz, Micheli G. Coutinho, Lúcia M.C. Galvão,  
Joaquim R. Cançado e Antoniana U. Krettlí

*Dois antígenos solúveis de tripomastigotas do Trypanosoma cruzi, um obtido de sobrenadantes de culturas celulares (AgSb) e o outro excretado/secretado por essas formas em meio de cultura (AgES), foram avaliados em um teste de ELISA para o diagnóstico da infecção chagásica e controle de cura de pacientes tratados. Os pacientes tratados apresentavam testes de lise mediada pelo complemento e hemoculturas repetidamente negativos, apesar de permanecerem com a sorologia convencional positiva (pacientes dissociados). O teste de lise negativo indica que estes pacientes eliminaram a infecção. Entre os controles com infecção ativa, os AgSb e os AgES detectaram respectivamente 93 e 100% dos casos. No entanto, entre os pacientes dissociados, o teste de ELISA, utilizando os AgSb e AgES, foi positivo com 28% e 5% dos soros, respectivamente. Portanto, este teste com os AgES é indicado para o controle de cura da doença de Chagas, podendo vir a substituir a reação de lise mediada pelo complemento no acompanhamento sorológico individual de pacientes tratados.*

*Palavras-chaves:* Trypanosoma cruzi. Antígenos solúveis de tripomastigotas. Pacientes chagásicos. Tratamento e cura. ELISA.

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma protozoose prevalente em todos os países da América Latina, onde afeta cerca de 16 a 18 milhões de pessoas<sup>24</sup>. Caracterizada por uma fase aguda que dura cerca de dois meses, com ou sem sintomas aparentes, essa infecção apresenta uma fase crônica que se prolonga por toda a vida do indivíduo. A maioria dos pacientes é diagnosticada na fase crônica geralmente através de testes de sorologia convencional (SC), sobretudo Imunofluorescência Indireta (IFI), Reação de Fixação do Complemento (RFC) e Hemaglutinação Indireta (HAI). Nesta fase, os tripomastigotas circulantes são escassos a julgar pelos resultados da literatura sobre xenodiagnóstico<sup>8</sup> e hemocultura<sup>10</sup>, ambos com baixa positividade.

O tratamento da doença de Chagas na fase aguda é importante porque previne a letalidade e diminui esse período de infecção, curando cerca de 50% dos casos<sup>9</sup>. Na fase crônica a eficácia dos medicamentos disponíveis, parece menor<sup>7</sup> e sua indicação é ainda, no mínimo, discutível. Após tratamento, a SC persiste positiva por muitos anos na maioria dos pacientes, mesmo naqueles com exames parasitológicos repetidamente negativos<sup>14</sup>. A negatização dos testes de SC, quando ocorre na fase crônica, é lenta e progressiva e se dá em uma pequena parcela dos indivíduos tratados<sup>7 12 19</sup>. A reação de lise mediada pelo complemento (LMCo) tem sido o único teste sorológico utilizado até o momento para identificar precocemente pacientes curados entre aqueles com SC positiva<sup>18</sup>. A classificação desses pacientes em dissociados foi feita com base na pesquisa de anticorpos, negativos no teste de LMCo porém positivos pela SC. Em 10 anos de acompanhamento após tratamento, os testes de LMCo e hemoculturas repetidamente negativos confirmaram a cura em 26% dos 82 pacientes tratados que ainda permaneceram com a SC positiva<sup>14</sup>. Os anticorpos detectados pela LMCo

Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz e Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Financiado pela FAPEMIG e CNPq.

Endereço para correspondência: Profa. Antoniana Ursine Krettlí. Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. Caixa Postal 1743, 30161-970, Belo Horizonte, MG.

Recebido para publicação em 30/12/93.

reconhecem antígenos na superfície de tripomastigotas vivos e circulam somente durante a infecção crônica ativa<sup>17</sup>. Apesar do teste de lise de tripomastigotas vivos predizer cura de pacientes tratados, este teste dificilmente poderá ser usado na rotina laboratorial para avaliação da eficiência terapêutica, porque exige o manuseio de parasitas infectantes, soro humano como fonte de complemento e a contagem tediosa do número de parasitas móveis em câmara de Neubauer.

Neste trabalho, procuramos substituir o teste de LMCo pelo teste de ELISA para monitorar o tratamento da doença de Chagas humana e prever cura em pacientes submetidos a 10 anos de acompanhamento<sup>14</sup>. Evidências de que tripomastigotas vivos liberam espontaneamente para o meio de cultura antígenos de superfície reconhecidos por soros de pacientes chagásicos<sup>16, 20</sup>, nos levaram a explorar o uso destes antígenos para discriminar pacientes tratados curados de não curados. Duas preparações antigênicas do *T. cruzi* foram avaliadas: a) sobrenadantes de cultivos celulares de tripomastigotas (AgSb) e, b) antígenos excretados/secretados por tripomastigotas de cultura celular (AgES).

## MATERIAL E MÉTODOS

**Soros humanos.** Soros de 34 indivíduos não chagásicos, do Centro de Pesquisas "René Rachou", Belo Horizonte e de 24 escolares residentes em Bambuí, MG, foram usados como controles negativos, na fase de padronização dos antígenos, com base nos resultados de três reações de SC negativas para o *T. cruzi* (IFI, RFC e HAI).

Soros de 37 pacientes chagásicos não tratados (CHA NT) e de 50 pacientes submetidos à quimioterapia específica pelo nifurtimox ou benzonidazol foram estudados. Os pacientes são da clínica do Prof. Joaquim Romeu Cançado (Faculdade de Medicina da UFMG) e foram previamente acompanhados, durante 3 a 10 anos, através da SC, da reação de LMCo e de hemoculturas repetidas<sup>18, 14</sup>. Os pacientes tratados já estavam classificados em três grupos: a) chagásico tratado não curado (CHA TNC) com LMCo e SC positivas (23 pacientes); b) chagásico tratado curado (CHA TC) com LMCo, SC e hemoculturas repetidamente

negativos (5 pacientes); c) chagásico tratado "dissociado" (CHATD) com testes de hemoculturas e LMCo negativos, mas com SC persistentemente positiva (22 pacientes). Os pacientes CHA NT, usados como controles positivos, apresentavam LMCo, SC e hemoculturas positivas.

Com a finalidade de avaliar a reatividade cruzada com os antígenos estudados no ELISA foram usados 53 soros de pacientes com leishmaniose (41 com leishmaniose tegumentar e 12 com leishmaniose visceral), 12 soros de pacientes com esquistossomose e 10 soros de pacientes com malária.

**Cultivo de tripomastigotas.** Formas tripomastigotas foram obtidas de células VERO infectadas com o *T. cruzi*, como anteriormente descrito<sup>14</sup>. Resumidamente,  $5 \times 10^5$  células VERO foram semeadas em frascos plásticos (Falcon, 75 cm<sup>2</sup>) com meio "Minimum Essential Medium" (MEM) completo, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, inativado a 56°C por 30 min) e incubadas a 37°C em estufa umidificada e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 1 ou 2 dias, os frascos foram inoculados com  $6 \times 10^6$  tripomastigotas da cepa Y e mantidos a 33°C e 5% de CO<sub>2</sub> em MEM com 1% de SFB. Os tripomastigotas surgiam em torno do 5º dia após a inoculação e sua produção contínua foi mantida através de passagens sucessivas em novos frascos com células. Sobrenadantes do cultivo para isolamento dos tripomastigotas e/ou de seus antígenos solúveis foram coletados no 6º dia de infecção.

**Antígenos de sobrenadantes de cultivo celular (AgSb).** Antígenos solúveis do *T. cruzi* foram obtidos por centrifugações de sobrenadantes de cultivos de tripomastigotas em células VERO a 4000g por 15min a 4°C para remoção dos parasitas e de restos celulares e, em seguida, a 10.000g por 10min. Estocados a -20°C, os sobrenadantes de vários cultivos foram descongelados, misturados e então concentrados 30 vezes a vácuo, dialisados exaustivamente em PBS, a 4°C, tratados com inibidores de proteases iodoacetamida, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e N-o-β-tosil-L-lisilclorometilcetona (TLCK) na concentração final de 2mM cada, sendo então aliquotados e congelados a -70°C até sua utilização nos testes de ELISA.

### **Antígenos excretados/secretados (AgES).**

Antígenos excretados/secretados por tripomastigotas vivos, foram obtidos segundo metodologia descrita anteriormente<sup>21</sup> com algumas modificações. Resumidamente, tripomastigotas de culturas celulares foram lavados duas vezes por centrifugação a 4.000g por 15min, a 4°C com MEM, suplementado com glutamina (0,2M) e soro albumina bovina (BSA) (100µg/ml), ressuspensos numa concentração de 2,5x10<sup>8</sup> parasitas/ml, incubados por 4 horas a 37°C e centrifugados a 4.000g por 15min. O meio de cultura contendo os antígenos de superfície do parasita foi centrifugado a 10.000g por 10min, tratado com inibidores de proteases, alíquotado e congelado a -70°C até sua utilização nas reações de ELISA, por no máximo 4 meses.

**Antígenos de sobrenadantes de células VERO.** Todos os soros foram diluídos com sobrenadantes de células não infectadas e incubados por 12 horas a 4°C antes de utilizados no ELISA. Esse sobrenadante consistiu no meio de manutenção das células VERO, obtido no 5º ou 6º dias de cultivo, após centrifugação a 10.000g por 10min. A reatividade desses sobrenadantes havia sido previamente padronizada por ELISA com 5 soros de pacientes chagásicos e resultou numa absorbância média de 0,033 ± 0,023, portanto negativa (dados não mostrados).

**Ensaio imunoenzimático (ELISA).** Placas de ELISA de 96 poços ("Immulon I" - Dinotech Laboratories, Alexandria, VA, USA) foram sensibilizadas por 12 horas a 4°C com 100µl/poço de AgSb ou de AgES diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH9,6. Após sensibilização das placas, a solução de antígeno foi desprezada e cada poço foi bloqueado com 200µl de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e 1% de BSA por 2 horas a 37°C. As placas foram então lavadas 10 vezes com PBS-T e a cada poço foram adicionados 100µl de soro pré-absorvido com sobrenadantes de células VERO não infectadas. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C, e novamente lavadas 10 vezes com PBS-T. A cada poço foi adicionado conjugado anti-IgG humana fração Fc específica, marcado com peroxidase (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), diluído 1000 vezes e as placas incubadas por mais 1 hora a 37°C. Finalmente, as

placas foram lavadas 10 vezes com PBS-T, em seguida adicionados 100µl por poço de uma solução v/v de 2,2-azino-di-3-etil sulfonato de benzotiazolone (ABTS) e peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após 10 minutos com "Sodium Dodecyl Sulfate" (SDS) e a densidade óptica medida a 405nm em leitor automático de ELISA (EIA Reader Model 2550 - BIO RAD Laboratories, Richmond, CA, USA).

## **RESULTADOS**

**Padronização do teste de ELISA.** A concentração ótima dos AgSb e dos AgES utilizada para sensibilizar placas de ELISA, foi determinada pelo nível de reatividade com soros de 8 indivíduos positivos (4 CHA NT e 4 TNC) e de 5 soros de indivíduos não chagásicos, diluídos 80 vezes. No caso dos AgSb as duas diluições testadas (1:20 e 1:40) corresponderam à liberação de antígenos por respectivamente 12x10<sup>6</sup> e 6x10<sup>6</sup> tripomastigotas/ml. As diluições foram necessárias para ajustar a concentração de um estoque de sobrenadantes concentrados a vácuo, no qual se conhecia o número total de parasitas que liberaram os antígenos. As médias dos valores de absorbância nas reações de ELISA são apresentadas na Figura 1A. Foi possível se evidenciar significativa discriminação entre soros negativos e positivos (p < 0,01) nas duas diluições do sobrenadante, sobretudo na diluição de 1:20, utilizada nos demais experimentos.

Os AgES foram inicialmente testados em diferentes diluições seriadas variando de 1:10 a 1:640. Diluições iguais ou inferiores a 1:160, permitiram melhor discriminação entre soros positivos e negativos, não se verificando diferenças significativas entre elas (Figura 1B). Para evitar gasto desnecessário de antígeno optou-se pelo antígeno diluído 160 vezes nos próximos testes.

A reatividade desse antígeno no teste de ELISA foi determinada após titulação de 20 soros de pacientes chagásicos (10 soros de CHA NT e 10 soros de CHA TNC) e 10 de indivíduos normais (Figura 2). Houve diferença significativa entre as médias das absorbâncias em cada diluição dos soros negativos e positivos (p < 0,05). Como o objetivo deste trabalho era identificar, entre os pacientes tratados com SC positiva, aqueles com LMCo negativa (pacientes dissociados), a diluição de

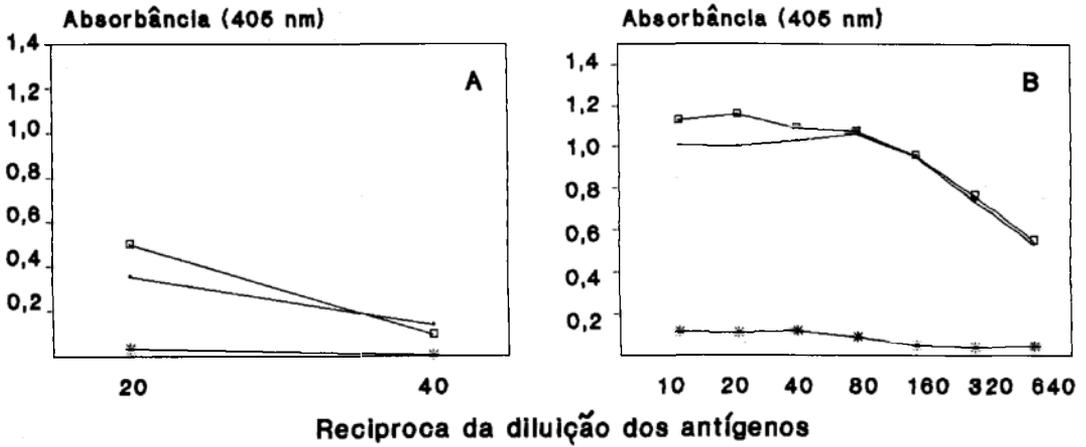


Figura 1 - Padronização dos AgSb (A) e dos AgES (B) no teste de ELISA. Média das absorvâncias produzidas por soros padrões positivos de chagásicos não tratados (-●-) e tratados não curados (-□-) e por soros padrões negativos de indivíduos normais (-\*-).

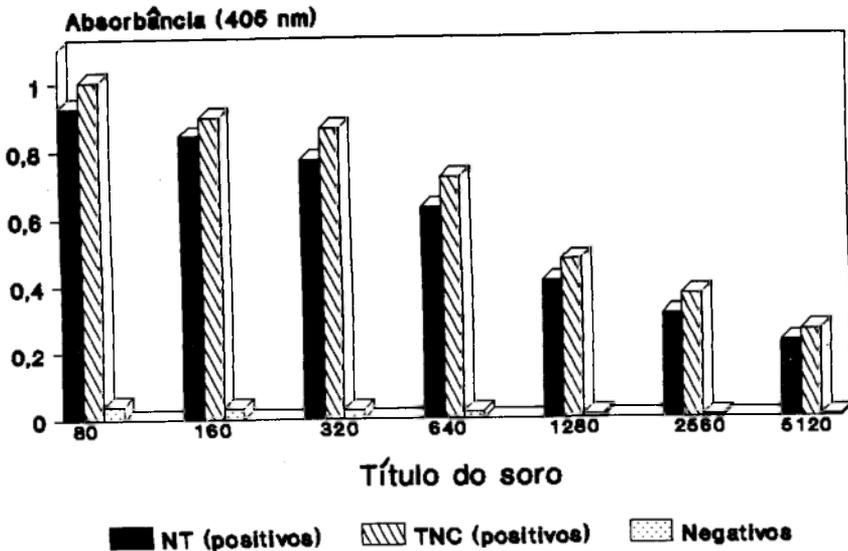


Figura 2 - Padronização dos soros no teste de ELISA com AgES. Média das absorvâncias produzidas por diferentes diluições de soros controles positivos (chagásicos não tratados, NT e tratados não curados, TNC) e soros controles normais com o antígeno diluído 160X.

1:5120 foi escolhida na tentativa de detectar apenas os anticorpos de maior especificidade para os AgES, nos experimentos a seguir. A diluição ótima dos soros testada com os AgSb e determinada em trabalho anterior<sup>15</sup> foi de 1:80.

**Absorvância discriminante entre soros positivos e negativos.** A determinação do valor de absorvância discriminante entre resultados positivos e negativos, nos testes de ELISA com os AgSb, foi feita com 58 soros de indivíduos não chagásicos,

sendo 34 de residentes em Belo Horizonte (MG) e 24 em Bambuí (MG). O limite de positividade foi estabelecido pela média das absorvâncias produzidas por esses soros normais, acrescida de dois desvios-padrão<sup>6</sup>, resultando em um valor de 0,250. Acima desse valor o resultado foi considerado positivo.

Com os AgES o limite de positividade no teste de ELISA foi calculado com base na reatividade com 60 soros de pacientes que apresentam infecção crônica ativa (37 soros de CHA NT e 23 de CHA TNC), diluídos 5120 vezes. Esse limite foi de 0,103 e resultou da média entre a menor absorvância obtida com o soro de um paciente CHA NT (0,101) e o soro de um CHA TNC (0,105).

**Avaliação da especificidade dos antígenos.** A especificidade do teste de ELISA com os AgSb foi avaliada pela reatividade com 33 soros de pacientes com outras infecções parasitárias, sendo 11 de pacientes com leishmaniose, 12 de pacientes com esquistossomose e 10 de pacientes com malária (Figura 3A). O maior índice de reações cruzadas ocorreu com soros de pacientes com leishmaniose (6 soros, 55%) seguido pelos soros de indivíduos com esquistossomose (2 soros, 17%). Entre os 58 soros normais, um foi positivo pela ELISA com valor de absorvância de 0,474, apesar de negativo em três diferentes testes de SC (dados não mostrados). Com base nos resultados dos soros de indivíduos normais e de indivíduos com outras parasitoses constatou-se reatividade cruzada em 10% dos soros, o que significa uma especificidade de 90%.

A especificidade do teste de ELISA com os AgES foi avaliada pela reatividade com soros de pacientes com leishmaniose (34 pacientes com leishmaniose tegumentar e 8 pacientes com leishmaniose visceral) e com soros de indivíduos normais. Todos os soros foram inicialmente testados na diluição de 1:80. Aqueles positivos foram então titulados em diluições seriadas de 1:640 a 1:5120 (Figura 3B). A análise estatística mostrou haver diferença significativa na média de absorvância entre os soros dos pacientes com leishmaniose e o grupo dos CHA NT em todos os títulos testados ( $p < 0,005$ ). Verificou-se reatividade cruzada apenas na diluição de 1:80 (24% dos soros). A média de absorvância dos soros de indivíduos com leishmaniose foi semelhante à dos indivíduos normais a partir da diluição de 1:1280 ( $p < 0,005$ ). Nenhum dos soros de indivíduos normais apresentou reatividade cruzada em qualquer das diluições testadas.

**Reatividade de soros de chagásicos com os AgSb.** Resultados individuais de absorvâncias dos soros de pacientes CHA não tratados e tratados com os AgSb são mostrados na Figura 4A. A porcentagem de positividade do teste, para cada grupo de pacientes CHA, foi calculada a partir do limite de positividade, tendo sido respectivamente de 89% para os CHA NT e de 96% para os CHA TNC. Portanto esse antígeno demonstrou alta sensibilidade em diagnosticar a infecção ativa. Os resultados dos testes com soros dos 5 pacientes CHA TC, com

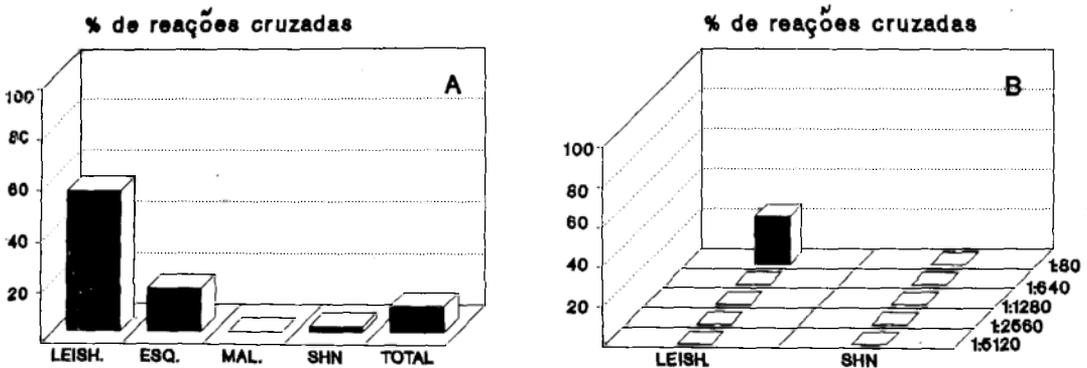


Figura 3 - Avaliação da especificidade do teste de ELISA com AgSb (A) e AgES (B), através da porcentagem média de reações cruzadas com soros de pacientes com outras parasitoses e com soros de indivíduos não chagásicos. Leish. = leishmaniose; Esq. = esquistossomose; Mal. = malária; SHN = soros humanos normais; total = soros de pacientes com outras parasitoses + soros normais.

testes de hemocultura, LMCo e SC sempre negativos<sup>14</sup>, foram semelhantes aos dos soros de indivíduos não chagásicos. Entre os 18 pacientes CHA TD (LMCo negativa, mas SC positiva), 72% foram negativos no teste de ELISA com AgSb. Portanto, a maior parte dos soros desses pacientes dissociados se comportou como soros de indivíduos não chagásicos, nesse teste (Figura 4A).

**Reatividade de soros de chagásicos com os AgES.** Os valores individuais de absorvância de soros diluídos 5120 vezes no teste de ELISA com os AgES estão resumidos na Figura 4B. Soros de 37 pacientes CHA NT e 23 CHA TNC, mostraram grande variação individual, porém todos com valores positivos (superiores a 0,100). Do total de 22 soros de pacientes CHA TD testados, 21 apresentaram valores de absorvância negativos, bem como todos os 31 soros de indivíduos não chagásicos. Somente o soro de um paciente TD apresentou absorvância igual a 0,097, próxima ao limite de positividade. Portanto, utilizando o antígeno diluído 160 vezes e os soros diluídos 5120 vezes, o teste de ELISA com AgES permitiu discriminar 95% dos soros de pacientes dissociados daqueles com infecção ativa.

## DISCUSSÃO

Os testes de SC, muito importantes para o diagnóstico da fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, apresentam limitações se utilizados como

critério de cura terapêutica. Assim, a maioria dos pacientes tratados permanece com a SC positiva apesar dos testes de hemocultura e xenodiagnóstico persistentemente negativos<sup>12 14</sup>. Evidências acumuladas após um longo acompanhamento de pacientes tratados indicam que anticorpos detectados pela SC podem existir na total ausência de infecção ativa. Resultados experimentais com animais imunizados com antígenos do *T. cruzi*<sup>17</sup> ou tratados e curados<sup>2</sup> corroboram essa observação. Em um estudo de acompanhamento de 10 anos de 82 pacientes tratados, somente 9% dos pacientes poderiam ter sido considerados curados pelos resultados negativos da SC<sup>14</sup>. Nesse mesmo trabalho 26% dos pacientes tratados com uma SC persistentemente positiva negativaram os testes de LMCo e de hemoculturas, sendo em média de 3,3 testes por paciente. Esses pacientes, descritos como “dissociados”, têm sido considerados curados apesar de sua SC persistentemente positiva. Em outro estudo de acompanhamento de 100 pacientes tratados, os níveis de cura foram igualmente reduzidos (8%) se usado como critério a negatificação da SC. No entanto, 60% desses pacientes apresentaram xenodiagnósticos repetidamente negativos<sup>12</sup>.

Com a finalidade de substituir o teste de LMCo por um teste mais simples para monitorar o tratamento da doença de Chagas humana e indicar cura, padronizamos o teste de ELISA utilizando duas preparações antigênicas de tripomastigotas de

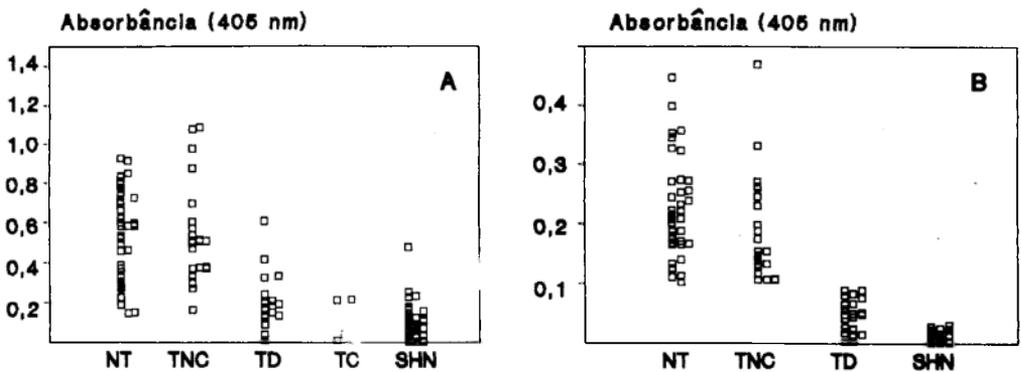


Figura 4 - Distribuição dos valores de absorvância dos soros de pacientes chagásicos não tratados e tratados e de indivíduos normais em ELISA com AgSb (A) e AgES (B).

NT= não tratados; TNC= tratados não curados; TD= tratados dissociados; TC= tratados curados; SHN= soros humanos normais.

*T. cruzi*. Nossos dados anteriores com ELISA, usando os AgSb ou uma glicoproteína purificada (Gp 57/51) mostraram a possibilidade de substituir o parasita vivo em testes sorológicos para controle de cura. Os AgES ora utilizados, se mostraram ainda mais específicos e mais sensíveis no diagnóstico da infecção chagásica e no controle de cura. Como AgSb e AgES consistem de antígenos liberados por tripomastigotas em meio de cultura, a maior sensibilidade e especificidade dos AgES pode ser resultante das condições de obtenção do mesmo. Enquanto os AgSb resultam da liberação de antígenos por cerca de  $12 \times 10^6$  parasitas por ml, os AgES foram obtidos de  $250 \times 10^6$  parasitas por ml. A preparação dos AgSb exige concentração a vácuo e diálise, dispensáveis na obtenção dos AgES. Presumivelmente, estas etapas de processamento dos AgSb contribuem para a degradação de alguns antígenos e conseqüentemente, diminuição da sensibilidade do teste de ELISA com esse antígeno.

A reatividade cruzada dos dois antígenos com soros de indivíduos com leishmaniose não foi surpreendente, pois o *T. cruzi* e *Leishmania sp* possuem epitopos semelhantes. Glicoproteínas contendo galactosil (Gal) terminal<sup>3 4 23</sup>, polissacarídes com unidades galactofuranosil (Galf)<sup>5</sup>, proteínas derivadas do citoesqueleto, como a tubulina, têm estruturas semelhantes em muitos tripanosomatídeos<sup>22</sup>.

Nenhum dos soros de indivíduos não chagásicos reagiu com os AgES, confirmando sua maior especificidade em relação aos AgSb. Entretanto um dos soros normais de Bambuí apresentou resultado positivo com os AgSb. Nessa localidade não existe transmissão natural da infecção pelo *T. cruzi*, desde 1976<sup>11</sup>. Portanto, esse soro, apesar de negativo nos outros testes de SC, deve apresentar níveis altos de anticorpos de reatividade cruzada como, por exemplo, anticorpos induzidos, por antígenos com epitopos Gal de bactérias da microflora intestinal normal<sup>13</sup>; por unidades Galf presentes em antígenos de fungos causadores de micoses<sup>5</sup> ou por proteínas estruturais do citoesqueleto de protozoários intestinais como *Entamoeba sp* e *Giardia sp*<sup>22</sup>.

Existem poucos trabalhos na literatura onde antígenos do parasita são usados em testes de controle de cura. Os primeiros resultados de ELISA

com antígenos liberados a 42°C por tripomastigotas mostram que a reatividade dos soros de pacientes dissociados foi significativamente mais baixa que a de soros de pacientes tratados não curados<sup>20</sup>. Com a gp 57/51, purificada da superfície de epimastigotas, apenas 30% dos soros de pacientes dissociados reagiram no ELISA<sup>15</sup>. Recentemente, em colaboração com o grupo do Prof. L.R. Travassos na Escola Paulista de Medicina, observamos que a maioria dos soros de pacientes dissociados não reage com uma fração (F2) purificada de um extrato total de tripomastigotas de cultura celular<sup>1</sup>. Nossos resultados mostraram que o nível médio de anticorpos detectados no ELISA foi significativamente mais baixo em soros de pacientes dissociados do que nos demais chagásicos. Os índices de coincidência de 70% e 95% entre os dados de LMCo negativa e os de ELISA, respectivamente, com os AgSb e com os AgES colocam estes antígenos como candidatos na avaliação de pacientes tratados.

Anticorpos anti- $\alpha$ Gal de baixa afinidade para antígenos solúveis do *T. cruzi*, descritos nos soros de pacientes dissociados<sup>15</sup> poderiam contribuir para a persistência da reatividade de 30% dos soros desses pacientes com os AgSb. Os pacientes positivos com os AgSb, no entanto, não reagiram com os AgES. Presumivelmente, a diluição alta dos soros (1:5120) selecionou os anticorpos de maior especificidade para os antígenos do *T. cruzi*. Portanto, apenas os pacientes com infecção ativa permaneceram positivos. Em relação ao limite de positividade, estabelecido para os soros diluídos 5120 vezes, existe, de fato, uma sobreposição de cerca de 5% entre os valores de aborbâncias dadas por soros de tratados não curados e tratados dissociados no teste de ELISA. Esta sobreposição se deu somente entre o soro de um paciente tratado não curado (ABS igual a 0,105) e o soro de um paciente tratado dissociado (ABS igual a 0,097) e não interfere com o resultado geral do teste de ELISA. Este discrimina os dois grupos de pacientes, como no teste de LMCo, e, ao contrário da IFI, por exemplo. Além disso, esse paciente tratado não curado com soro de baixa reatividade no teste de ELISA, pode indicar evolução para cura e deve ser acompanhado.

Sugerimos que o teste de ELISA com os AgES

poderá vir a substituir a reação de LMCo na avaliação individual de cura de pacientes submetidos a tratamento específico. Os AgES são de fácil obtenção não sendo necessárias etapas de purificação, podem ser utilizados em laboratórios de rotina e conservam sua estabilidade até pelo menos 4 meses, quando mantidos aliqüotados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### SUMMARY

Two soluble antigens isolated from *T. cruzi* were evaluated by ELISA for the diagnosis of chronic infection and assessment of cure after specific chemotherapy, namely, supernatants from parasite cell-cultures (SpAg) and trypomastigote excretory/secretory antigens (ESAg). Among the treated patients, a group defined as "dissociated" had been monitored for 3 to 10 years and displayed negative hemocultures and tests of trypomastigote complement-mediated lysis persistently negative although positive by conventional serology (indirect fluorescence with epimastigote, mainly). A negative lysis test indicates parasite elimination by the patient. Our ELISA results showed that among the non-treated chagasic controls the SpAg e ESAg detected 93% and 100%, of the cases, respectively. However, only 28% of sera from the dissociated group, considered as cured, were positive by ELISA using SpAg whereas all of such sera were negative using ESAg. Therefore ELISA with ESAg seems to be ideal to replace the complement-mediated lysis test with the aim to define cure after treatment of the chronic infection by *T. cruzi*.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Soluble antigens of trypomastigotes. Chagasic patients. Treatment and cure. ELISA.

### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Zigman Brener pela leitura crítica do manuscrito e sugestões. À Zélia M.P. Luz pela eficiente ajuda técnica.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida IC, Krautz GM, Kretti AU, Travassos L. Glycoconjugate of *Trypanosoma cruzi*: A 74 kD antigen of trypomastigotes specifically reacts with lytic anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease. Journal of Clinical Laboratory Analysis 7: 307-316, 1993.
2. Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Terapêutica da fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi* com o Benzonidazol e o Nifurtimox. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 23: 209-211, 1990.
3. Avila JL, Rojas MA. Galactosyl ( $\alpha$ 1-3) mannose epitope on phospholipids of *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* recognized by trypanosomatid-infected human sera. Journal Clinical Microbiology 28: 1530-1537, 1990.
4. Avila JL, Rojas M, Towbin H. Serological activity against galactosyl- $\alpha$ (1-3)galactose in sera from patients with several kinetoplastida infections. Journal of Clinical Microbiology 26: 126-132, 1988.
5. Camargo ZP, Travassos LR. Cross reactive epitopes of *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp* and *Paracoccidioides brasiliensis* containing  $\beta$ -galactofuranose units. In: Resumos da XVII Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu p.67, 1990.
6. Campbell GH, Brandling-Bennett AD, Roberts JM, Collins FH, Kaseje DCO, Barber AM, Turner A. Detection of antibodies in human sera to the repeating epitope of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* using the synthetic peptide (NANP)<sub>3</sub> in an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 37: 17-21, 1987.
7. Cançado JR. Standardization of protocols for chemotherapy of Chagas' disease. In: Steering Committee on Chemotherapy and Parasitology, World Health Organization, Washington p.15, 1981.
8. Castro CN, Alves MT, Macêdo VO. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 16: 98-103, 1983.
9. Cerisola JA, Russo MC, Prado C, Yozami LBJ, Rohweder RW. Estudio comparativo de diversos métodos parasitológicos en la enfermedad de Chagas aguda. In: Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas, Sociedad Argentina de Protozoología, Buenos Aires p.97-100, 1972.
10. Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnostic of human chronic Chagas' disease. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 22:19-23, 1989.
11. Dias JCP. Control of Chagas disease in Brazil. Parasitology Today 3: 336-341, 1987.
12. Ferreira HO. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benzonidazol. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 23: 209-211, 1990.
13. Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shoet SB, Griffis JM. Interaction between human natural anti-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of human

Krautz GM, Coutinho MG, Galvão LMC, Caçado JR, Krettli AU. Antígenos solúveis liberados por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizados no teste de ELISA para detectar cura em pacientes chagásicos após tratamento específico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27:199-207, out-dez, 1994.

- flora. *Infection and Immunity* 56: 1730-1737, 1989.
14. Galvão LMC, Nunes RMB, Caçado JR, Brener Z, Krettli AU. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas' disease: a 10 years follow-up study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87: 220-223, 1993.
  15. Gazzinelli RT, Galvão LMC, Krautz GM, Lima APCA, Scharfstein J, Krettli AU. Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GP57/51) or trypomastigote shed antigens to gauge cure in human Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 49: 625-635, 1993.
  16. Gonçalves FG, Umezawa ES, Katzin AM, De Souza W, Alves MJ, Zingales B, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: Shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Experimental Parasitology* 72: 43-53, 1991.
  17. Krettli AU, Caçado JR, Brener Z. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 334-340, 1982.
  18. Krettli AU, Brener Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigotes antibodies. *The Journal of Immunology* 128: 2009-2012, 1982.
  19. Krettli AU, Caçado JR, Brener Z. Criterion of cure of human Chagas' disease after specific chemotherapy: recent advances. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79: 157-164, 1984.
  20. Martins MS, Hirsch C, Krettli AU, Tavares CAP. Specific diagnosis of Chagas' disease with antigen(s) shedded by tissue culture derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. In: *Resumos da XV Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu p.124, 1988.*
  21. Norris KA, Hart G, So M. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infection and Immunity* 57: 2372-2377, 1989.
  22. Seebeck T, Hemphill A, Lawdson D. The cytoskeleton of trypanosomes. *Parasitology Today* 6: 49-52, 1990.
  23. Towbin H, Rosdenfelder G, Wieslander J, Avila JL, Rojas M, Szarfman A, Esser K, Nowack J, Timpl R. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas' disease, american cutaneous leishmaniasis and normal individuals recognize terminal galactosyl alfa galactose epitopes. *Journal Experimental Medicine* 166: 419-432, 1987.
  24. World Health Organization. *Tropical Disease Research: progress in international research, 1989-1990.* Geneva: Atar, 1991.