



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PROTEÍNAS RECOMBINANTES QUIMÉRICAS DO *Trypanosoma cruzi* COMO
FERRAMENTA DIAGNÓSTICA PARA IDENTIFICAR A DOENÇA DE CHAGAS
CRÔNICA ATRAVÉS DO WESTERN BLOT**

RAMONA TAVARES DALTRO

Salvador - Bahia

2021

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

**PROTEÍNAS RECOMBINANTES QUIMÉRICAS DO *Trypanosoma cruzi* COMO
FERRAMENTA DIAGNÓSTICA PARA IDENTIFICAR A DOENÇA DE CHAGAS
CRÔNICA ATRAVÉS DO WESTERN BLOT**

RAMONA TAVARES DALTRO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos

Coorientador: Prof.; Dr. Carlos Gustavo Regis

Salvador - Bahia

2021

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Daltro, Ramona Tavares.

D152p Proteínas recombinantes quiméricas do *Trypanosoma cruzi* como ferramenta diagnóstica para identificar a doença de Chagas crônica através do *Western blot* / Ramona Tavares Daltro, 2021.

88 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos, Laboratório Avançado de Saúde Pública.

Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2021.

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Imunodiagnóstico. 4. *Western blot*.

I. Título.

CDU 616.937

“PROTEÍNAS RECOMBINANTES QUIMÉRICAS DO TRYPANOSOMA CRUZI COMO FERRAMENTA
DIAGNÓSTICA PARA IDENTIFICAR A DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA ATRAVÉS DO WESTERN
BLOT”.

RAMONA TAVARES DALTRO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 05 de agosto de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Márcia Cristina Aquino Teixeira
Professora Associada
UFBA



Dr. Job Alves de Souza Filho
Pesquisador
Funed



Dra. Tycha Bianca Sabaini Pavan
Pesquisadora
INI FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de

Financiamento 001

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação Oswaldo Cruz (INOVA Fiocruz)

Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz (IGM)

AGRADECIMENTOS

Foi uma longa jornada até este momento. Desenvolver um projeto de mestrado é uma tarefa árdua, que envolve muita responsabilidade, tempo e organização. Levarei esta experiência e os ensinamentos aprendidos para minha vida, tanto pessoal como profissional. Diante deste imenso desafio, eu pude contar com meus amigos e minha família, sem os quais seria ainda mais difícil chegar à conclusão do processo, e é por isso que eu gostaria de agradecer a todos os envolvidos, que contribuíram direta e indiretamente para que este resultado fosse alcançado.

Primeiramente, agradeço de coração à minha família: minha mãe, Virgínia e meu pai, Valber. Vocês fizeram (e fazem) de tudo para que eu seja “alguém na vida”. Seus esforços para me proporcionar a melhor educação possível, a melhor estrutura e a melhor qualidade de vida foram imprescindíveis para a minha formação, tanto profissional quanto pessoal. Vocês sempre me apoiaram, em qualquer momento, dia e noite. São minha base. Obrigada.

Patric, meu marido. Este não é o primeiro e nem o último projeto no qual você está inserido. Não me lembro de um momento relevante da minha história em que você não estivesse presente, você é meu passado, presente e futuro. Vamos juntos, rumo ao doutorado! Por tudo, obrigada.

Ao grupo SerdYtech, em especial: Ângelo, Emily, Leonardo e Natália; vocês são incríveis. O melhor presente que a iniciação científica me deu, eu não sei o que seria de mim sem vocês e sem sua paciência. Obrigada por me ajudar a prosseguir e a animar todos os meus dias. Amo vocês.

Aos amigos que a vida me trouxe, que me acompanham a cada passo que eu dou, me apoiando e me aconselhando nos momentos mais difíceis.

Minha vó, dona Ilda. Mulher forte, guerreira, exemplo de vida! Eu não tenho palavras para descrever a sua importância na minha vida. Devo tudo à senhora. Sou grata, eternamente.

Ao meu coorientador, Dr. Carlos Regis. Agradeço pelos ensinamentos e paciência. Levo uma enorme bagagem deste mestrado, graças ao senhor.

E por último, mas nem de longe, menos importante: meu orientador, Dr. Fred Santos. Obrigada imensamente pela oportunidade concebida. Por sempre estar disponível a nos ajudar, a nos aconselhar e nos acompanhar. Eu tenho muita sorte por ser sua orientanda, digo isso com toda convicção.

No mais, agradeço à FIOCRUZ, ao LASP, ao LAPEM, ao LIB, à biblioteca e a todos os colaboradores e Instituições parceiras.

O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.

Isaac Newton

DALTRO, Ramona Tavares. Proteínas recombinantes quiméricas do *Trypanosoma cruzi* como ferramenta diagnóstica para identificar a doença de Chagas crônica através do *Western blot*. 2021. 88 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A doença de Chagas (DC) é causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Sua forma de infecção pode ser vetorial, oral ou congênita, além da transfusão sanguínea. No Brasil, o número de indivíduos infectados varia de 1,9 a 4,6 milhões e, na América Latina, de 5 a 7 milhões. A fase crônica da doença é caracterizada pela presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* e o seu diagnóstico é realizado por métodos sorológicos, principalmente o ELISA indireto. A OMS preconiza a utilização de dois testes distintos para o diagnóstico da DC e a combinação dos resultados define os indivíduos como positivos, negativos ou, no caso de discordância entre eles, inconclusivos. Neste último caso, um teste confirmatório deve ser empregado, como o *Western blot* (WB) ou a PCR; no entanto, esta última apresenta baixa sensibilidade na fase crônica da doença. Quatro antígenos recombinantes quiméricos, denominados IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 foram expressos pelo nosso grupo e avaliados em estudos de fase I, II e III, utilizando o ELISA, o microarranjo líquido e a imunocromatografia, obtendo acurácia de 95 a 100%. Estes antígenos também foram submetidos à avaliação para detecção da DC em cães. Em 2016, o único teste de *Western blot* produzido no Brasil foi descontinuado e, por conta disso e devido ao elevado desempenho diagnóstico conferido aos antígenos IBMP, investigamos a utilização destas moléculas em diagnosticar a DC utilizando ensaios de WB. **OBJETIVO:** Avaliar e validar o desempenho diagnóstico dos antígenos recombinantes quiméricos do *T. cruzi* (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4) como matrizes antigênicas utilizando plataforma de WB no diagnóstico da DC crônica. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram avaliadas 22 amostras positivas, 24 negativas e 3 positivas para leishmaniose visceral. A padronização dos ensaios foi realizada através de diferentes diluições dos antígenos, dos anticorpos conjugados e das amostras séricas. A validação do potencial diagnóstico foi realizada através de curvas ROC. A reatividade cruzada também foi avaliada para leishmaniose visceral. **RESULTADOS:** Todos os antígenos IBMP apresentaram 100% de sensibilidade, especificidade e acurácia, com exceção do antígeno IBMP-8.3, que obteve 90,9% de sensibilidade, 100% de especificidade e 95,7% de acurácia. Todavia, não houve diferença significativa nos referidos valores. **CONCLUSÕES:** No presente estudo (fase I ou prova de conceito), os antígenos IBMP apresentaram elevada capacidade em diferenciar amostras positivas das negativas para a DC, sendo, portanto, elegíveis para o estudo de fase II.

Palavras-chave: doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Imunodiagnóstico, *Western blot*.

DALTRO, Ramona Tavares. *Trypanosoma cruzi* chimeric recombinant proteins as a diagnostic tool to identify chronic Chagas disease through Western blot. 2021. 88 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, 2021.

ABSTRACT

BACKGROUND: Chagas disease (CD) is caused by the hemoflagellate parasite *Trypanosoma cruzi*, which can be transmitted via vectorial, oral, or congenital routes, in addition to blood transfusion. In Brazil, the estimated number of infected individuals ranges from 1.9 to 4.6 million and, in Latin America, from 5 to 7 million. The chronic phase of the disease is characterized by the presence of anti-*T. cruzi* IgG antibodies and its diagnosis is performed through serological methods, especially by indirect ELISA. The World Health Organization (WHO) recommends the use of two tests, of distinct methods, for CD diagnosis, in which their agreement renders in a positive, negative, or inconclusive diagnosis. In the latter case, a confirmatory test should be employed, such as Western blot (WB) or PCR; however, direct methods, such as PCR, offers a low sensitivity during the chronic phase of the disease. Four chimeric recombinant antigens, herein denominated as IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 and IBMP-8.4 were expressed and evaluated in phase I and II studies by our group, using ELISA, liquid microarray and immunochromatography, obtaining accuracy from 95 to 100 %. These antigens were also evaluated for detection of canine CD. In 2016, the only WB test available in Brazil was discontinued and therefore, to fill in the gap left by its discontinuation and due to the high diagnostic performance observed for the IBMP antigens in other studies, we investigated the use of these molecules in CD diagnosis employing WB assays. **OBJECTIVE:** To evaluate and validate the diagnostic performance of four chimeric recombinant *T. cruzi* antigens (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 and -8.4) deployed in a WB platform for CD chronic diagnosis. **METHODS:** 22 positive, 24 negative chronic CD samples and 3 positive visceral *Leishmaniasis* samples were evaluated. Assays were standardized through checkerboard titration of different antigens, conjugated secondary antibody, and sera dilutions. The diagnostic potential validation was performed using ROC curves. Cross-reactivity was also evaluated for visceral *Leishmaniasis*. **RESULTS:** All IBMP antigens obtained 100% sensitivity, specificity, and accuracy, except the IBMP-8.3 antigen, which showed 90.9% sensitivity, 100% specificity and 95.7% accuracy. However, there was no statistically significant difference among these values. **CONCLUSION:** In the present study (phase I or proof of concept), the IBMP antigens exhibited a high capacity to differentiate positive from negative samples for CD, being, therefore, eligible for the phase II study.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Immunodiagnosis, Western blot.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas.....	10
Figura 2	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
Figura 3	Habitats dos triatomíneos em áreas endêmicas para a doença de Chagas.....	12
Figura 4	Principais espécies de triatomíneos transmissores da doença de Chagas.....	13
Figura 5	Número estimado atual de imigrantes com infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> em países não endêmicos.....	17
Figura 6	Sinais de entrada do <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 7	Ressonância magnética de indivíduos acometidos pela forma cardíaca da doença de Chagas, na qual a fibrose pode ser visualizada como a área branca inserida no músculo (escuro), indicadas pelas setas.....	19
Figura 8	Radiografia de megaesôfago (A) e megacólon chagásicos (B).....	20
Figura 9	Evolução natural da doença de Chagas em humanos.....	21
Figura 10	Desenho esquemático do esfregaço sanguíneo e exame de gota espessa para o diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda.....	23
Figura 11	Representação esquemática de uma reação de hemaglutinação indireta (HAI) positiva.....	24
Figura 12	Representação esquemática de uma reação de imunofluorescência indireta (IFI).....	25
Figura 13	Representação esquemática do teste de ELISA.....	26
Figura 14	Desenho esquemático mostrando as porcentagens de poliacrilamida usadas no gel.....	28
Figura 15	Representação esquemática do teste de <i>Western blot</i>	29
Figura 16	Fluxograma do diagnóstico sorológico para a detecção da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
Quadro 1	Composição dos antígenos recombinantes quiméricos IBMP.....	31
Figura 17	Padrões de resposta de classe latente e probabilidade à posteriori dos antígenos IBMP para o diagnóstico preciso da DC crônica.....	33
Figura 18	Representação esquemática da transferência no sistema semi-seco.....	38
Figura 19	Representação esquemática do painel amostral do estudo.....	40

Figura 20	Imagens obtidas no <i>ImageQuant LAS 4000</i> para mensuração da intensidade de cor nas áreas de reação e <i>background</i> , usando o <i>software Image J</i>	43
Figura 21	SDS-PAGE dos antígenos IBMP corados pelo azul de Coomassie com 1 µg de antígeno distribuído por poço.....	45
Figura 22	Avaliação da diluição da amostra por <i>Dot-Blot</i>	47
Figura 23	Avaliação da diluição do anticorpo secundário por <i>Dot-Blot</i>	48
Figura 24	Avaliação da quantidade de antígeno IBMP-8.4 para ser utilizado nos ensaios de <i>Western blot</i>	49
Figura 25	Avaliação da quantidade de antígeno IBMP-8.1 para ser utilizado nos ensaios de <i>Western blot</i>	50
Figura 26	Avaliação da quantidade de antígeno IBMP-8.2 para ser utilizado nos ensaios de <i>Western blot</i>	50
Figura 27	Avaliação da quantidade de antígeno IBMP-8.3 para ser utilizado nos ensaios de <i>Western blot</i>	51
Figura 28	Representação gráfica das intensidades relativas de bandas dos antígenos IBMP no estudo de fase I e parâmetros de desempenho diagnóstico utilizando o <i>Western blot</i> como plataforma diagnóstica.....	52
Figura 29	Imagens das membranas de nitrocelulose após reação com amostras positivas para a doença de Chagas utilizando as moléculas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4.....	53
Figura 30	Imagens das membranas de nitrocelulose após reação com amostras negativas para a doença de Chagas utilizando as moléculas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4.....	54
Figura 31	Análise gráfica e visual da reatividade cruzada dos antígenos IBMP para leishmaniose visceral utilizando o <i>Western blot</i> como plataforma diagnóstica.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição dos géis de separação e de concentração em SDS-PAGE.....	37
Tabela 2	Recaracterização das amostras usadas para a padronização dos imunoensaios, estudo de Fase I e reatividade cruzada.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acurácia
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
AL	Alagoas
AMCHA	Iniciativa dos Países Amazônicos para Vigilância e Controle da Doença de Chagas (<i>Initiative of the Amazon Countries for Surveillance and Control of Chagas Disease</i>)
AP	Amapá
AUC	Área abaixo da curva (<i>Area Under Curve</i>)
BA	Bahia
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAR	Forma cardíaca
CLIA	Testes quimiluminescentes
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio-padrão
DPP	<i>Dual path platform</i>
DTU	Unidade de tipagem discreta (<i>Discrete Typing Unit</i>)
ECG	Eletrocardiograma
ECL	Quimiluminescência aprimorada (<i>Enhanced chemiluminescence</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ESP	Especificidade
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FN	Falso negativo
FP	Falso-positivo
GO	Goiás
HAI	Hemaglutinação indireta
HCl	Ácido clorídrico
HRP	Peroxidase de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano (<i>Human T-Lymphotropic Virus</i>)

IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
ICC	Instituto Carlos Chagas
IC95%	Intervalo de Confiança de 95%
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
INCOSUR	Iniciativa Cone Sul
IPA	Iniciativa dos Países Andinos para o Controle da Transmissão Vetorial e Transfusional da Doença de Chagas
IND	Forma indeterminada
IR	Índice de Reatividade
LAPEM	Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular
LASP	Laboratório Avançado de Saúde Pública
LCA	Análise de classe latente (<i>Latent Class Analysis</i>)
LCS	<i>Status</i> da classe latente
LFA	Imunoensaio de fluxo lateral (<i>Lateral flow assay</i>)
LIB	Laboratório de Inflamação e Biomarcadores
LMA	Microarranjo líquido (<i>Liquid microarray</i>)
MG	Minas Gerais
MIS	Forma mista
NEG	Amostras negativas
NTC	Nitrocelulose
OMS	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
PAHO	Organização Pan-Americana da Saúde (<i>Pan American Health Organization</i>)
PBS	Tampão Fosfato-salina (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBS-Tween	Tampão fosfato-Tween 20 (<i>Phosphate buffered saline-Tween</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Pernambuco
pH	Potencial Hidrogeniônico
POS	Amostras positivas
PP	Probabilidade a posteriori

qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RBI	Intensidade relativa de banda (<i>Relative band intensity</i>)
RC	Reatividade cruzada
RN	Rio Grande do Norte
ROC	Característica de Operação do Receptor (<i>Receiver operating characteristic</i>)
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SENS	Sensibilidade
SNR	Relação sinal-ruído
SUS	Sistema único de saúde
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TESA	Antígeno secretado-excretado de tripomastigota (<i>Trypanosoma cruzi excretory-secretory antigens</i>)
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
WB	<i>Western blot</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetros
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual que
≥	Maior ou igual que
°C	Graus Celsius
g	Gramas
h	Hora
kDa	Quilodaltons
mA	Miliampere
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MM	Massa molecular
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PM	Peso molecular
\bar{X}	Média aritmética
κ	Índice Kappa de Cohen
μl	Microlitro
V	Volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	6
2	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1	HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	9
2.2	O PARASITO.....	10
2.3	VIAS DE TRANSMISSÃO	11
2.3.1	Vetorial	11
2.3.2	Transfusional	13
2.3.3	Congênita	14
2.3.4	Oral	14
2.4	EPIDEMIOLOGIA	15
2.5	ASPECTOS CLÍNICOS.....	17
2.5.1	Fase aguda	17
2.5.2	Fase crônica	18
2.5.2.1	<i>Fase crônica indeterminada</i>	18
2.5.2.2	<i>Forma cardíaca</i>	19
2.5.2.3	<i>Forma digestiva</i>	19
2.6	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	21
2.6.1	Diagnóstico parasitológico	22
2.6.2	Diagnóstico sorológico indireto	23
2.7	<i>WESTERN BLOT</i>	27
2.8	ANTÍGENOS IBMP	30
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	36
4.2	LOCAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E PROCEDIMENTOS	36
4.3	OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....	36

4.4	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)	36
4.5	TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS PARA A MEMBRANA DE NITROCELULOSE (NTC)	36
4.6	<i>DOT-BLOT</i> PARA PADRONIZAÇÃO DO SORO E ANTICORPO SECUNDÁRIO	36
4.7	PAINEL SOROLÓGICO	36
4.7.1	Dimensionamento amostral	39
4.7.2	Obtenção e caracterização do painel sorológico	39
4.7.3	Critérios de inclusão	42
4.7.4	Critérios de exclusão	42
4.8	ASPECTOS ÉTICOS	42
4.9	EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO	42
4.9.1	Análise das imagens	42
4.9.2	Análise estatística	43
5	RESULTADOS	45
5.1	SDS-PAGE DOS ANTÍGENOS IBMP	45
5.2	PAINÉIS SOROLÓGICOS	45
5.2.1	Recaracterização sorológica	45
5.2.2	Padronização do WB	46
5.3	ESTUDO DE FASE I	51
5.4	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA	54
6	DISCUSSÃO	56
6.1	<i>WESTERN BLOT</i> NO DIAGNÓSTICO DA DC	57
6.2	PADRONIZAÇÃO DO WB-IBMP	60
6.3	REATIVIDADE CRUZADA	61
7	CONCLUSÕES	63
8	PERSPECTIVAS	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE	76

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença negligenciada causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A via tradicional de transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo do inseto hematófago pertencente aos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, os quais são popularmente conhecidos como barbeiros. A infecção começa a partir da passagem das formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, encontradas nas fezes e urina contaminadas do inseto vetor, para a corrente sanguínea do hospedeiro. A DC também pode ocorrer por via congênita, por transfusão de sangue, doação de órgãos e ingestão de alimentos contaminados (RASSI, 2010). Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina (OMS, 2021) e, no Brasil, este número varia de 1,9 a 4,6 milhões de infectados (DIAS, 2016).

A DC ocorre em duas fases: a aguda e a crônica. Na aguda, os parasitos circulam na corrente sanguínea e, desta maneira, o diagnóstico é realizado a partir da observação direta do *T. cruzi* no sangue periférico. O método mais recomendada nesta fase é o exame parasitológico direto. Ao final da fase aguda inicia-se a crônica, a qual é marcada pela presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* e baixa parasitemia. Devido a estas características, os métodos sorológicos são aplicados para o diagnóstico laboratorial da DC nesta fase, sendo a hemaglutinação indireta, a imunofluorescência indireta e o ELISA os mais comumente empregados (GOMES, 2009).

Dentre os métodos sorológicos, o ELISA é o mais usado devido ao seu baixo custo, possibilidade de automação e capacidade de diagnosticar vários indivíduos concomitantemente (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). Todavia, dentre outras razões, o seu desempenho varia de acordo com a preparação antigênica utilizada na sensibilização da fase sólida. Os testes que utilizam extrato bruto ou semi-purificado do parasito apresentam elevada sensibilidade e baixa especificidade. Estas características ocorrem devido ao elevado quantitativo de reatividade cruzada (RC), principalmente com espécies do gênero *Leishmania* spp. (DALTRO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2016a). Já os testes que utilizam preparações antigênicas compostas por peptídeos sintéticos ou antígenos recombinantes apresentam elevada especificidade, diminuindo o quantitativo de RC. Tais testes podem ser usados com segurança em áreas co-endêmicas para leishmaniose e DC. Contudo, em virtude da extensa variabilidade genética do *T. cruzi*, relatos de resultados falso-negativos são comuns na literatura (SANTOS *et al.*, 2017a; UMEZAWA *et al.*, 1999). Este fato ocorre com mais

frequência quando estes testes são utilizados para diagnosticar a infecção em indivíduos residentes em diferentes regiões geográficas (CABALLERO *et al.*, 2007). Uma tentativa de resolver estes problemas, diminuindo o quantitativo de resultados indesejados (falso-negativos e falso-positivos), baseia-se na utilização de antígenos recombinantes quiméricos. De fato, estas moléculas são compostas por epítomos conservados e repetitivos de diversas proteínas do parasito, aumentando a sensibilidade dos testes em diagnosticar indivíduos residentes tanto em áreas endêmicas quanto em áreas não endêmicas para a DC (DEL-REI *et al.*, 2019; DOPICO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2017a). Uma outra vantagem na utilização deste tipo de molécula baseia-se no fato de que elas podem ser formadas por epítomos que não apresentam similaridade ou homologia com as sequências proteicas presentes em outros parasitos, mantendo alta a sua especificidade (AGUIRRE *et al.*, 2006; DALTRO *et al.*, 2019).

Tendo isso em mente, o nosso grupo desenhou e expressou quatro antígenos recombinantes quiméricos, denominados IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 (SANTOS, 2016), e seu potencial diagnóstico foi avaliado em estudos de fase I (SANTOS *et al.*, 2016a), II (SANTOS *et al.*, 2017a) e III (SANTOS, 2020) utilizando o ELISA, o microarranjo líquido (SANTOS *et al.*, 2017b), a imunocromatografia (SILVA, 2016) e a ressonância plasmônica de superfície (CORDEIRO *et al.*, 2020) como plataformas diagnósticas. Nestes estudos foram obtidos valores elevados de acurácia e reprodutibilidade, bem como baixos índices de RC com outras doenças infecto-parasitárias, especialmente leishmaniose (DALTRO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2017a).

A Organização Mundial da Saúde preconiza a utilização de dois testes de princípios metodológicos distintos para o diagnóstico da doença na fase crônica, já que não há um padrão ouro estabelecido. A combinação do resultado de ambos os testes indicará se o indivíduo é positivo, negativo ou inconclusivo (OMS, 2007). No último caso, um teste confirmatório deve ser empregado, como o ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) ensaios de imunoblot utilizando antígenos recombinantes, ensaios de *Western blot* (WB) ou a reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo esta última desaconselhada na fase crônica devido a sua baixa sensibilidade (DO BRASIL; CASTRO; DE CASTRO, 2016).

A RIPA é uma técnica complexa, laboriosa e dispendiosa, além de ter uso restrito por conta da necessidade de radioatividade (KIRCHHOFF, L. V. *et al.*, 1987; LEIBY, D.A., *et al.*, 2000). O ensaio INNO-LIA[®] Chagas é um imunoblot comercialmente disponível que usa como preparo antigênico sete antígenos recombinantes sintéticos: CRA, FRA, Tc-24, SAPA, MAP, TcD e Ag39, presentes em uma única tira de membrana. Embora apresente alto desempenho diagnóstico, tem difícil interpretação dos resultados e seu alto custo limita seu

uso (OELEMANN, W.; TEIXEIRA, M.; PERALTA, J., 1999; OELEMANN W., *et al.*, 1999; SAEZ-ALQUÉZAR *et al.*, 2000; DA SILVEIRA, J.F.; UMEZAWA E.S.; LUQUETTI A.O., 2001). O TESAcruzi (BioMérieux SA, São Paulo - SP, Brasil) – teste comercial de WB disponível no Brasil e no mundo - era rotineiramente usado como confirmatório para a DC, porém, em 2016, teve a sua produção descontinuada pelo fabricante por conta do seu alto custo, baixa demanda comercial, produção laboriosa e variabilidade entre lotes, deixando uma lacuna na confirmação do diagnóstico da DC. Desta forma, devido ao elevado desempenho diagnóstico conferido aos antígenos quiméricos IBMP e à necessidade de testes confirmatórios para o diagnóstico da DC, propomos investigar o potencial destas moléculas em diagnosticar a DC em indivíduos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* utilizando o WB como plataforma diagnóstica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Em 1909, o médico e cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879–1934) (Figura 1) foi responsável pela descoberta da doença de Chagas (DC), do seu agente etiológico, vetor, bem como pela descrição dos principais aspectos clínicos relacionados à infecção (COUTINHO; DIAS, 1999). Em 1908, durante o combate à malária em Lassance, Minas Gerais, Carlos Chagas encontrou no sangue de um sagui uma nova forma de tripanossomatídeo, que foi denominado *Trypanosoma minasense*. Logo depois, sua atenção foi voltada a um inseto hematófago que se escondia nas frestas das casas e se alimentava dos seres humanos à noite enquanto dormiam. Ao examinar o intestino dos insetos, popularmente chamados de barbeiros, Carlos Chagas encontrou parasitos similares àqueles observados no sagui (KROPF; SÁ, 2009). A confirmação da nova doença ocorreu quando Carlos Chagas, ao examinar Berenice, uma menina de dois anos de idade que apresentava febre, edema e congestão linfática generalizada, encontrou no seu sangue os mesmos parasitos observados nos barbeiros. Ao agente etiológico da doença, deu o nome de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem ao médico e seu mestre, Oswaldo Cruz (CHAGAS, 1909). Contribuições adicionais para o esclarecimento da patogênese da DC foram realizadas pelo patologista brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna (1885–1914), que descreveu a forma amastigota do parasito no coração humano e nas células musculares esqueléticas, bem como pelo parasitologista francês Émile Brumpt (1877–1951), que divulgou o modo de transmissão natural da infecção pelas fezes do triatomíneo (MONCAYO, 2010).

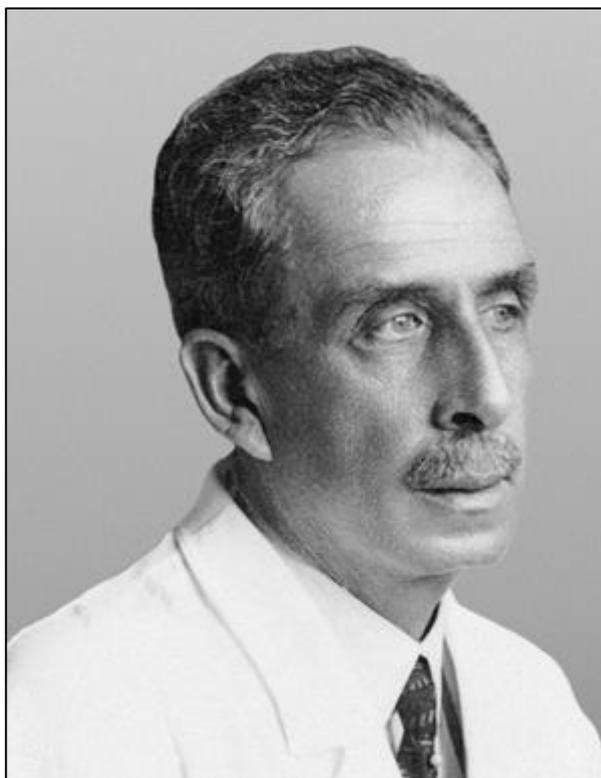


Figura 1: Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas.

Fonte: Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (2002).

2.2 O PARASITO

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado causador da DC. Pertence ao super-reino Metakaryota, reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina e família Trypanosomatidae (CAVALIER-SMITH, 2009). Possui um ou dois flagelos emergentes da bolsa flagelar, localizada próxima ao cinetoplasto, organela onde se localiza o k-DNA, uma condensação do DNA (BRENER, 1973).

O *T. cruzi* possui três formas evolutivas que se diferenciam quanto ao metabolismo, capacidade replicativa, posição do cinetoplasto e do flagelo (Figura 2). A forma tripomastigota infectante não replicativa é extracelular, alongada, encontrada no sangue dos hospedeiros vertebrados e no tubo digestivo dos triatomíneos. O cinetoplasto se posiciona posteriormente ao núcleo e próximo à bolsa flagelar. Lateralmente a esta bolsa flagelar, emerge o flagelo, que se estende junto ao corpo do parasito, formando uma membrana ondulante. A forma amastigota é encontrada no interior das células hospedeiras; tem formato arredondado sem flagelo livre. Já a forma epimastigota é encontrada no intestino médio dos triatomíneos, onde

se multiplica por divisão binária. É extracelular e alongada, replicativa, com o cinetoplasto e a bolsa flagelar localizados anteriormente ao núcleo, com o flagelo emergindo lateralmente (BRENER, 1997).

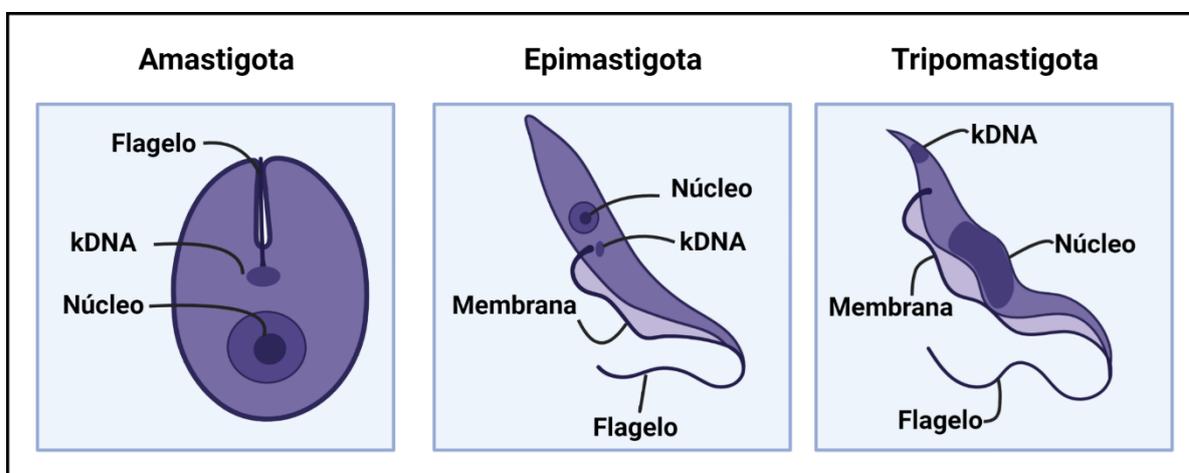


Figura 2: Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*

Fonte: Acervo Grupo SerdYtech.

2.3 VIAS DE TRANSMISSÃO

2.3.1 Vetorial

O *T. cruzi* pode ser transmitido através das fezes e urina do triatomíneo infectado com o parasito. O ciclo de vida do parasito ocorre quando o triatomíneo se alimenta de sangue contaminado com a forma tripomastigota circulante. No estômago do inseto, os parasitos se diferenciam em epimastigotas e migram para o intestino, onde se multiplicam intensamente e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Em um novo repasto sanguíneo, o inseto hematófago libera em seus excrementos a forma infectante do parasito que penetra o organismo do indivíduo através de solução de continuidade da pele ou mucosas (GARCIA *et al.*, 2010; STANAWAY; ROTH, 2015). As tripomastigotas invadem macrófagos, fibroblastos e células epiteliais e se diferenciam em amastigotas mantendo uma baixa taxa de replicação. As amastigotas se replicam no citosol e se transformam novamente em tripomastigotas, invadindo a corrente sanguínea do hospedeiro e atingindo vários tecidos, estabelecendo a infecção, que permanece ativa por toda a vida do indivíduo infectado (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012).

Os triatomíneos possuem um ciclo de vida longo e dependem da disponibilidade de sangue de animais. Estes insetos possuem hábitos noturnos e são fotófobos e, por conta disso, picam indivíduos ou animais enquanto estes dormem. Os triatomíneos apresentam baixa

mobilidade, pois apenas os insetos adultos possuem asas. Durante o dia, os barbeiros se escondem nas frestas das casas de sapo (ou casas de pau-a-pique), chiqueiros, galinheiros e ninhos de pássaros (Figura 3) (SCHOFIELD, 1979; SILVEIRA, A. C.; DIAS, 2011).

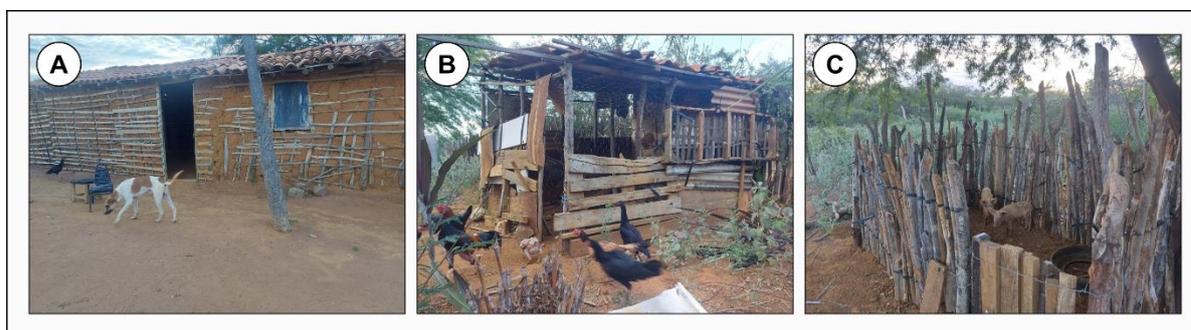


Figura 3: Habitats mais comuns dos triatomíneos em áreas endêmicas para a doença de Chagas.

Legenda: (A) Casa de pau-a-pique com rachaduras e frestas onde os triatomíneos podem se abrigar. Observar a presença de animais de companhia no peridomicílio; (B) Presença de galinheiro no peridomicílio; (C) Presença de pocilga no peridomicílio. A presença de cães, aves e suínos pode atrair triatomíneos para repasto sanguíneo e, assim, manter o ciclo de vida peridomiciliar do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Acervo grupo SerDYtech.

A transmissão vetorial ocorre somente nas regiões onde há presença do inseto vetor, se estendendo desde o sul dos Estados Unidos e países das Américas Central ao sul da Argentina e Chile (ANTINORI *et al.*, 2017). Mais de 130 espécies de triatomíneos já foram identificadas, e três gêneros são mais relevantes para a transmissão do *T. cruzi*: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (Figura 4) (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). O *Triatoma infestans* é o principal vetor da DC na América do Sul, é adaptado a ambientes domésticos, porém também está presente em áreas silvestres, como na Bolívia, onde há relatos de aumento na população selvagem do inseto (BUIRAGO *et al.*, 2010; WALECKX *et al.*, 2011, 2012) e outros países como Argentina, Chile, Paraguai e Uruguai (BACIGALUPO *et al.*, 2010; CEBALLOS *et al.*, 2009; ROLÓN *et al.*, 2011). No Brasil, o *T. infestans* é exclusivamente doméstico, não havendo relatos de sua captura em ambientes selvagens. Apesar do sucesso alcançado durante as campanhas de combate ao *T. infestans*, resultando em certificação internacional da erradicação desta espécie no país, ainda há focos residuais nos estados do Rio Grande do Sul e Bahia (BRENIÈRE *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2014; GURGEL-GONÇALVES *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2019). O *T. infestans* se apresenta em uma grande diversidade de habitats, sendo decorrente de sua capacidade de adaptar-se facilmente a diferentes ecótopos, tanto em ambientes peridomiciliares quanto domiciliares. Esta habilidade

faz do *T. infestans* uma ameaça, já que facilmente se adapta a áreas antropizadas (RIBEIRO *et al.*, 2015).

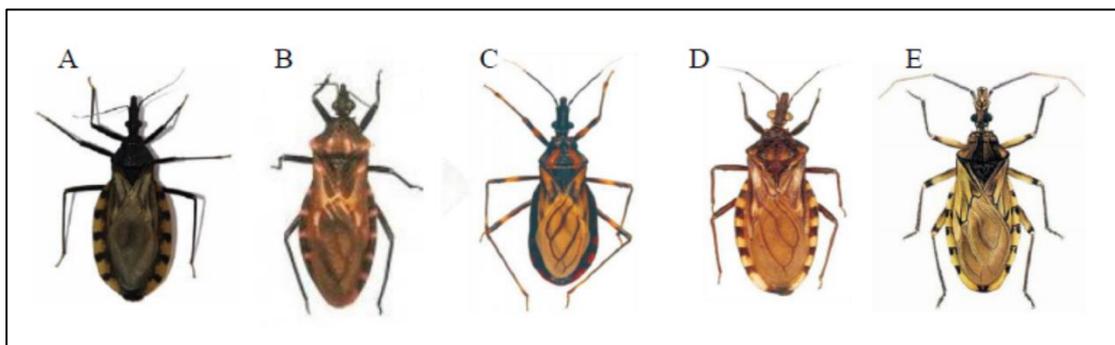


Figura 4: Principais espécies de triatomíneos transmissores da doença de Chagas.

Legenda: (A) *Triatoma infestans*; (B) *Panstrongylus megistus*; (C) *Triatoma brasiliensis*; (D) *Triatoma pseudomaculata*; (E) *Triatoma sordida*.

Fonte: Repolês (2014).

Existem outros vetores de alta relevância encontrados no Brasil, como o *P. megistus*, que apresenta vasta distribuição geográfica no país, da região Sul a região Nordeste, com elevada concentração nos estados de Minas Gerais e Bahia, onde pode ser encontrado em áreas silvestres, peridomiciliares e domésticas; no Sul, o *P. megistus* é essencialmente selvagem (BRENIÈRE *et al.*, 2017). Além do Brasil, esta espécie está presente desde as Guianas até a Argentina, além do Paraguai e Bolívia. Já o *T. brasiliensis* é característico dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e nordeste da Bahia, no peridomicílio, áreas domésticas e selvagens, e encontra-se normalmente associado ao *T. pseudomaculata* (CORRÊA, R. R.; SPINOLA, H.N, 1964).

2.3.2 Transfusional

A segunda via mais comum de transmissão do *T. cruzi* é a transfusional (COURA, 2015). Este tipo de transmissão era mais comum em áreas endêmicas, pobres, sem disponibilidade de testes de triagem para investigação dos doadores. Com o êxodo rural e a saída de indivíduos destas regiões para cidades mais desenvolvidas (como São Paulo, por exemplo) entre os anos de 1950-1970, houve o aumento de casos de transmissão por transfusão sanguínea no Brasil nos grandes centros urbanos (WENDEL; GONZAGA, 1993).

A implementação da triagem sorológica nos hemocentros do Brasil, Uruguai, Chile e outros países da América do Sul e Central levou à redução da transmissão da DC por esta via. Porém, ainda existem países endêmicos que não realizam controle dos doadores de sangue,

assim como muitos países não endêmicos que recebem migrantes infectados de áreas endêmicas, o que aumenta a disseminação da DC para outros continentes. Dentre os países não endêmicos com ocorrência desta forma de transmissão, os mais comuns são os EUA, Espanha e alguns países da Europa, Ásia e Oceania (COURA; VIÑAS, 2010; COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014).

2.3.3 Congênita

Com a diminuição do número de indivíduos infectados por transmissão vetorial e transfusional, houve maior evidência dos casos transmitidos por via congênita, chegando a ser considerada a principal forma de transmissão da doença na população humana em algumas localidades (PAHO, 2004). Além disso, por conta do fluxo migratório, esta forma de transmissão é uma das principais responsáveis pelos casos em países não endêmicos, contribuindo com a globalização da DC (CARLIER; TORRICO, 2003; MUÑOZ *et al.*, 2009; PAHO, 2004). A maioria das gestantes infectadas encontra-se na fase crônica da DC e não apresenta os sintomas característicos, porém, mesmo assintomáticas, estas mulheres correm maior risco de ter parto prematuro, recém-nascidos com baixo peso ou natimortos. Os recém-nascidos, por sua vez, podem apresentar sintomas característicos da DC, como a hepatoesplenomegalia, miocardite, anemia ou meningoencefalite; entretanto a maioria é assintomática. Uma progressão para o estágio crônico cardíaco ou digestivo é observada em cerca de 30% dos indivíduos infectados pela via congênita (CARLIER; TRUYENS, 2010; ZHANG; TARLETON, 1999). A infecção ocorre quando formas tripomastigotas alcançam o feto pela via hematogênica através da placenta; eles atravessam o epitélio trofoblástico e atingem a circulação fetal através do estroma das vilosidades (BRENER *et al.* 2000; CARLIER; TRUYENS, 2010). Há também uma menor possibilidade da transmissão congênita do *T. cruzi* ocorrer pela via oral, com a ingestão do líquido amniótico contaminado (CARLIER *et al.*, 2012).

2.3.4 Oral

A transmissão oral ocorre através da ingestão da forma tripomastigota do *T. cruzi* presente em bebidas e alimentos contaminados, como a cana-de-açúcar, a bacaba e o açaí, quando os triatomíneos são triturados durante a preparação ou suas fezes contaminam os alimentos. Diversos surtos foram relatados sendo esta via considerada a principal causa de

infecção, principalmente na região amazônica (DIAS *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2016; WHO, 2020), onde entre 1968 e 2000, 50% dos casos de DC aguda ocorreram devido à infecção oral. Entre 2000 e 2010, houve aumento deste percentual para 70% (SANTOS *et al.*, 2020).

Em 2005 foram reportados casos em no estado de Santa Catarina, além de outros no Espírito Santo (DARIO *et al.*, 2016). Anteriormente, em 1986 no estado da Paraíba um surto de transmissão oral foi identificado, devido ao consumo de cana-de-açúcar (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991). Mais recentemente, em 2019, o estado de Pernambuco protagonizou casos de DC oralmente transmitida (GÓES *et al.*, 2019), provavelmente por conta do consumo de comidas ou bebidas contaminadas.

A via oral é responsável pela mais alta taxa de mortalidade em indivíduos infectados (8 a 35%), quando comparada à via vetorial (<5 a 10%) (BENCHIMOL BARBOSA, 2006; JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; NÓBREGA *et al.*, 2009; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2012).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que a DC esteja presente como enzoose nas Américas antes da chegada dos seres humanos por mais de 10 milhões de anos (ARAÚJO *et al.*, 2009). A DC se tornou uma antroponose a cerca de 10.000 anos, quando começaram a surgir os primeiros assentamentos e atividades agrícolas (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004).

A DC ocorre principalmente em áreas rurais e pobres da América Latina e é considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). De acordo com estimativas recentes desta Organização, na América Latina, mais de 70 milhões de pessoas moram em áreas de risco de contrair a infecção e 5 a 7 milhões de indivíduos encontram-se infectados pelo *T. cruzi* (OMS, 2015). A Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO) estima que 60.000 novos casos ocorram a cada ano (PAHO, 2006). O maior quantitativo de indivíduos infectados encontra-se na Argentina, Brasil, México e Bolívia. (ANGHEBEN *et al.*, 2011; ANTINORI *et al.*, 2015; JACKSON *et al.*, 2010; ROCA *et al.*, 2011). No início dos anos 90, a doença foi considerada a mais séria entre todas as doenças parasitárias na América Latina pelo *World Bank*, com um impacto econômico e social superior aos efeitos combinados de todas as outras infecções parasitárias (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002). A transmissão vetorial do *T. cruzi* somente é observada em regiões endêmicas por causa da presença de mais de 130 espécies do triatomíneo transmissor da

doença, encontrados desde o sul dos Estados Unidos ao sul da América Latina. A transmissão ocorre principalmente pelos insetos pertencentes aos gêneros *Triatoma* (*T. infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*), *Rhodnius* (*R. prolixus*) e *Panstrongylus* (*P. megistus*) (ANTINORI *et al.*, 2017; STEVENS *et al.*, 2011).

Os países endêmicos, juntamente com a PAHO, estabeleceram programas regionais para garantir a prevenção e o controle da DC. A Iniciativa Cone Sul (INCOSUR) foi o primeiro programa criado, em 1991, pelos governos da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai. Posteriormente, outros programas foram criados, como a Iniciativa da América Central (IPA) em 1998, a Iniciativa dos Países Americanos (AMCHA) em 2003 e a Iniciativa Mexicana, em 2004 (PAHO, 2014). Foi possível observar uma redução significativa na transmissão da doença pelo *T. infestans*, principal vetor nos países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai e Bolívia) e pelo *R. prolixus* na América Central. Além disso, a transmissão por transfusão sanguínea também sofreu redução na América Latina (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002). As mortes anuais estimadas diminuíram globalmente de 45.000 em 1990 para cerca de 11.000 em 2008, enquanto o número estimado de infecções diminuiu de 30 milhões em 1990 para 8 milhões em 2006 e a incidência anual durante este mesmo período caiu de 700.000 para 56.000 (PAHO, 2014).

A despeito da diminuição do número de casos nos países endêmicos, houve dispersão da DC para países indenes a partir dos anos de 1990, tornando a DC um problema de saúde pública mundial (Figura 5). A principal causa desta dispersão baseia-se no aumento do fluxo migratório de indivíduos infectados da América Latina para a Europa (especialmente Espanha, Portugal, Itália e Suíça), Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália. Em 2009, o número estimado de pessoas infectadas vivendo na Europa variava entre 70.000 e 130.000 aproximadamente, com mais de 4.000 casos confirmados e 94-96% de casos não diagnosticados (BASILE *et al.*, 2011; SCHMUNIS, 2007).

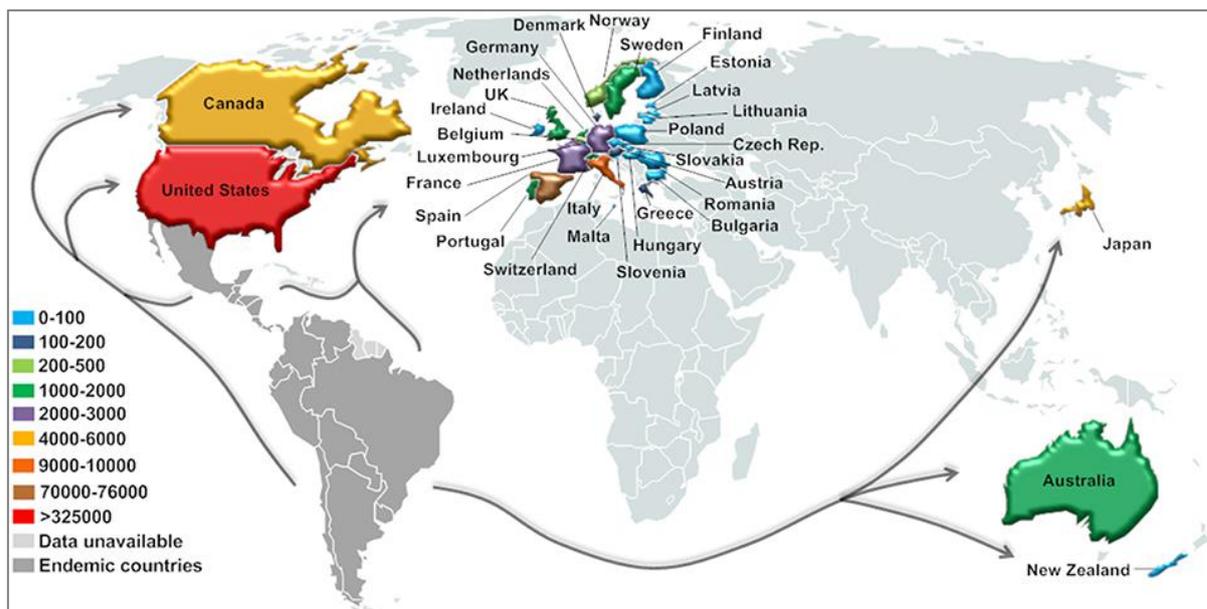


Figura 5: Número estimado atual de imigrantes com infecção por *Trypanosoma cruzi* em países não endêmicos.

Fonte: Lidani *et al.* (2019).

2.5 ASPECTOS CLÍNICOS

A DC possui duas fases: aguda e crônica. A primeira pode durar cerca de três meses, sendo caracterizada por sintomas inespecíficos como febre prolongada, dor de cabeça e inchaço no rosto e pernas. A fase crônica, na maioria das vezes, ocorre de maneira assintomática e persiste por vários anos, porém, 30 a 40% dos infectados evoluem para forma sintomática, caracterizada por acometimento cardíaco, digestivo ou ambos (forma mista) (MARIN-NETO *et al.*, 2002; RIBEIRO; ROCHA, 1998).

2.5.1 Fase aguda

A entrada do *T. cruzi* no organismo é marcada por uma inflamação, denominada chagoma de inoculação (Figura 6C e 6D). Quando a entrada do parasito se dá pela mucosa ocular, pode haver conjuntivite e edema bupalpebral unilateral denominado sinal de Romaña (Figura 6A e 6B). As manifestações clínicas da infecção podem ocorrer concomitantemente, com febre, linfadenopatia difusa, esplenomegalia leve e hepatomegalia (PRATA, 2001). A doença aguda grave ocorre em menos de 1% dos infectados e o alto grau de parasitemia pode resultar em miocardite aguda, inflamação do trato gastrointestinal (principalmente esôfago e cólon), meninges e tecidos nervosos centrais e periféricos (BERN; MARTIN; GILMAN, 2011; GASCON; BERN; PINAZO, 2010). Nesta fase, o parasito é facilmente detectado no sangue periférico por técnicas parasitológicas diretas e o seu término ocorre de três a quatro

meses pós-infecção, quando o sistema imunológico reduz a parasitemia, sendo necessária a utilização de técnicas de diagnóstico sorológico para detecção indireta do parasito.



Figura 6: Sinais de entrada do *Trypanosoma cruzi*.

Legenda: Sinal de Romaña (A e B) e chagoma de inoculação no braço (C e D).

Fonte: Rassi *et al.* (2017).

2.5.2 Fase crônica

2.5.2.1 Fase crônica indeterminada

Na fase crônica, aproximadamente 70% dos infectados não apresentam qualquer sintomatologia relacionada à DC, caracterizando a forma clínica indeterminada. De fato, o eletrocardiograma (ECG) não indica anormalidades nestes indivíduos, assim como exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon. A maioria dos indivíduos infectados em áreas endêmicas apresenta a forma indeterminada da DC (DIAS, 1989; RIBEIRO; ROCHA, 1998).

2.5.2.2 Forma cardíaca

A cardiomiopatia chagásica (Figura 7) é a manifestação clínica mais comum e importante da DC, causadora da maioria dos quadros de morbimortalidade (ANDRADE *et al.*, 2011). Embora geralmente classificada como tendo um padrão hemodinâmico de cardiomiopatia dilatada, a distribuição predominante típica da fibrose nas regiões posterior e apical do ventrículo esquerdo e o envolvimento do nó sinusal e do sistema de condução elétrica distinguem a DC de outras cardiomiopatias. As manifestações clínicas da cardiopatia chagásica resultam de anormalidades na condução elétrica, disfunção contrátil do miocárdio, arritmias ou tromboembolismo (ROCHA; RIBEIRO; TEIXEIRA, 2003). Na maioria dos estudos, a morte súbita é a causa geral mais comum de morte (55-60%), seguida de insuficiência cardíaca (25-30%) e eventos embólicos (10-15%), mas as proporções variam de acordo com a população estudada (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2009; RASSI *et al.*, 2001).

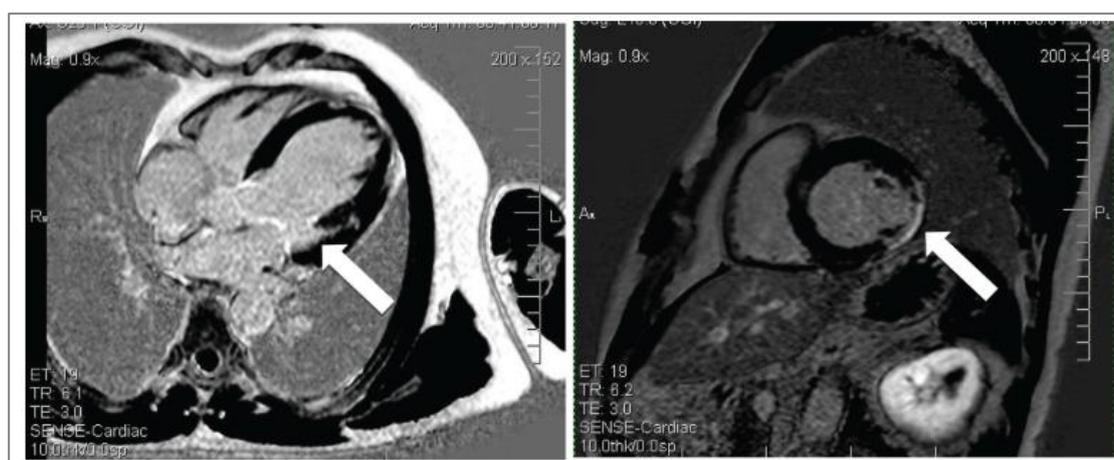


Figura 7: Ressonância magnética de indivíduos acometidos pela forma cardíaca da doença de Chagas, na qual a fibrose pode ser visualizada como a área branca inserida no músculo (escuro), indicadas pelas setas.

Fonte: Simões *et al.* (2018).

2.5.2.3 Forma digestiva

As manifestações digestivas da DC estão mais intensamente localizadas no esôfago e no cólon e são basicamente disfagia e constipação, devido a alterações crônicas que podem levar ao megaesôfago e/ou megacólon (Figura 8). Como a doença causa lesão do sistema nervoso autônomo em todo o trato gastrointestinal, pode-se observar anormalidades anatômicas e funcionais das glândulas salivares, estômago, ductos biliares extra-hepáticos, duodeno, intestino delgado, intestino grosso e até mesmo órgãos não pertencentes ao trato

gastrointestinal, como o ureter, por exemplo. É possível observar alterações nas funções motora, secretora e absorptiva do trato gastrointestinal. As lesões do sistema nervoso entérico são fundamentais na patogênese das megasíndromes digestivas. O principal afetado é o plexo mioentérico de Auerbach, localizado entre as camadas musculares longitudinal e circular do trato digestivo, que sofre uma redução acentuada das células nervosas. A maioria dos danos aos neurônios deste plexo e das fibras nervosas ocorre durante a infecção aguda, porém perda neuronal adicional ocorre lentamente durante toda a fase crônica. A denervação ocorre em graus variáveis, é irregular e simultânea e provavelmente depende de fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro. A denervação leva à perda da coordenação motora e acalasia dos esfíncteres, impedindo que estes segmentos esvaziem o material semissólido, causando dilatação; este é o mecanismo fisiopatológico subjacente ao megaesôfago chagásico e megacólon (RASSI *et al.*, 2017). O megaesôfago causa disfagia, regurgitação e dor. Há também a ocorrência de outros sintomas, como soluços, pirose e hipersalivação acompanhados por hipertrofia da parótida. A desnutrição ocorre com a progressão da doença (RASSI; RASSI, 2012).

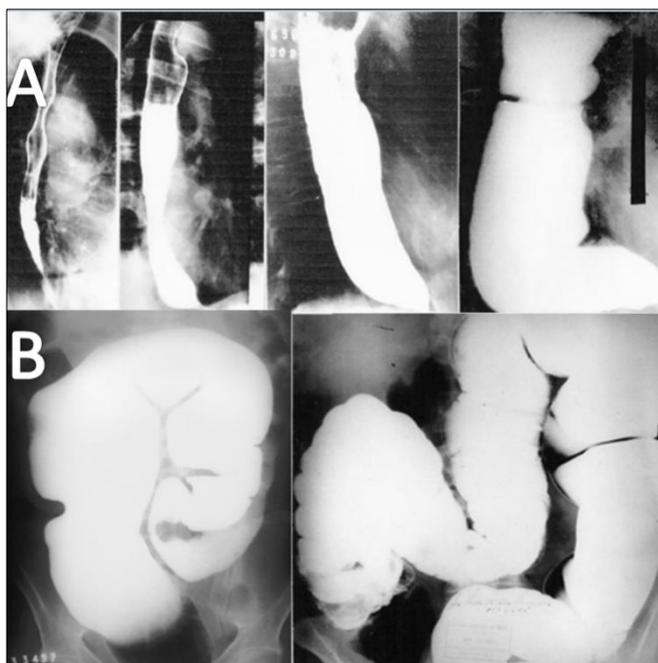


Figura 8: Radiografia de megasôfago (A) e megacólon chagásicos (B).
Fonte: Rassi *et al.* (2017).

2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da DC depende do estágio infeccioso em que a doença se encontra: fase aguda ou crônica (Figura 9). No início fase aguda, os títulos de anticorpos IgM anti-*T. cruzi* são elevados, assim como a parasitemia. Por conta destas características, as técnicas parasitológicas diretas são as mais utilizadas, como exame direto e análise de gota espessa. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e os métodos parasitológicos indiretos, como o hemocultivo e o xenodiagnóstico, podem ser empregadas alternativamente (DIAS *et al.*, 2016).

Quando o indivíduo evolui para a fase crônica, os níveis de anticorpos IgM específicos decrescem, a parasitemia torna-se intermitente e subpatente e há aumento dos títulos de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, diminuindo a sensibilidade de técnicas parasitológicas e da PCR, sendo empregadas métodos sorológicos indiretos, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), testes imunocromatográficos, a imunofluorescência indireta (IFI), a hemaglutinação indireta (HAI) e ensaios quimiluminescentes (CLIA) (RASSI; RASSI, 2012; SANTOS *et al.*, 2017b).

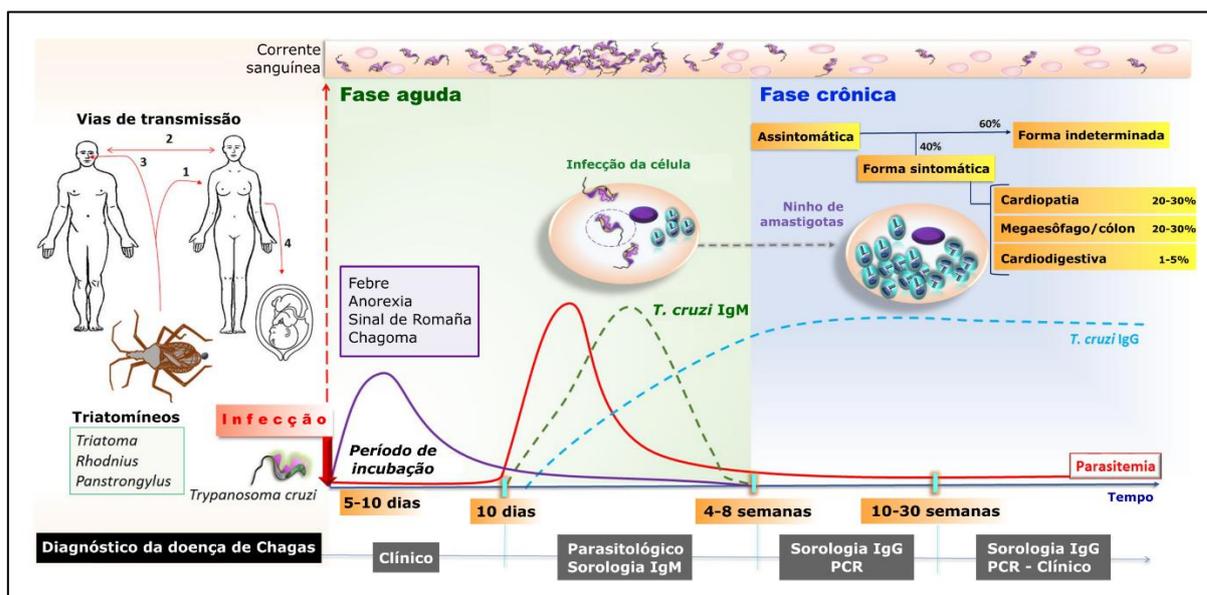


Figura 9: Evolução natural da doença de Chagas em humanos.

Nota: A transmissão do *Trypanosoma cruzi* pode ocorrer por (1) transfusão sanguínea vetorial (2) ou transplante de órgãos, (3) vias orais ou (4) congênitas. O período de incubação dura de 5 a 10 dias pós-infecção, o qual é seguido pela fase aguda com duração de 4 a 8 semanas. Esta fase é caracterizada por formas tripomastigotas circulantes, que podem ser visualizadas no sangue e pela presença de IgM anti-*T. cruzi*. Os anticorpos anti-*T. cruzi* podem ser detectados após 10 dias de infecção. A maioria dos indivíduos apresenta sintomas inespecíficos, como febre e anorexia, ou é assintomática, podendo desenvolver inflamação e inchaço no local de

inoculação na pele ou conjuntiva, caracterizando o chagoma de inoculação e o sinal de Romaña, respectivamente. A fase crônica começa quando a parasitemia reduz a níveis indetectáveis pela microscopia, geralmente 4 a 8 semanas pós-infecção. Desta forma, o diagnóstico é baseado na detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* ou através de testes moleculares. Nesta fase, a maioria dos infectados adentra uma forma assintomática prolongada, conhecida como forma indeterminada, e nunca desenvolverá sintomas relacionados à doença de Chagas. No entanto, 10 a 30 anos pós-infecção, 30-40% dos indivíduos desenvolvem manifestações clínicas, podendo ser relacionadas a queixas cardíacas, digestivas ou cardiodigestivas (mistas).

Fonte: Modificado de Lidani *et al.*, (2017, tradução nossa).

2.6.1 Diagnóstico parasitológico

Na fase aguda da DC a forma tripomastigota do parasito é encontrada por observação direta no sangue periférico (BERN *et al.*, 2011). Os métodos parasitológicos diretos têm como vantagem o baixo custo e facilidade de execução, já que o material necessário para a sua realização pode ser encontrado em laboratórios com infraestrutura reduzida (LUQUETTI; SCHMUÑIS, 2017). Os mais utilizados são a microscopia da gota fresca de sangue e a gota espessa corada (Figura 10), sendo o primeiro considerado o padrão-ouro para esta fase (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). Os métodos de concentração (Strout, microhematócrito ou creme leucocitário) são indicados nos casos em que há suspeita de infecção há mais de 30 dias. São mais sensíveis do que os citados acima, e são indicados quando a pesquisa a fresco apresenta resultados negativos (BRASIL, 2013). Há também a possibilidade da utilização de técnicas de biologia molecular, como o emprego da PCR ou PCR em tempo real (qPCR), bem como o hemocultivo e o xenodiagnóstico.

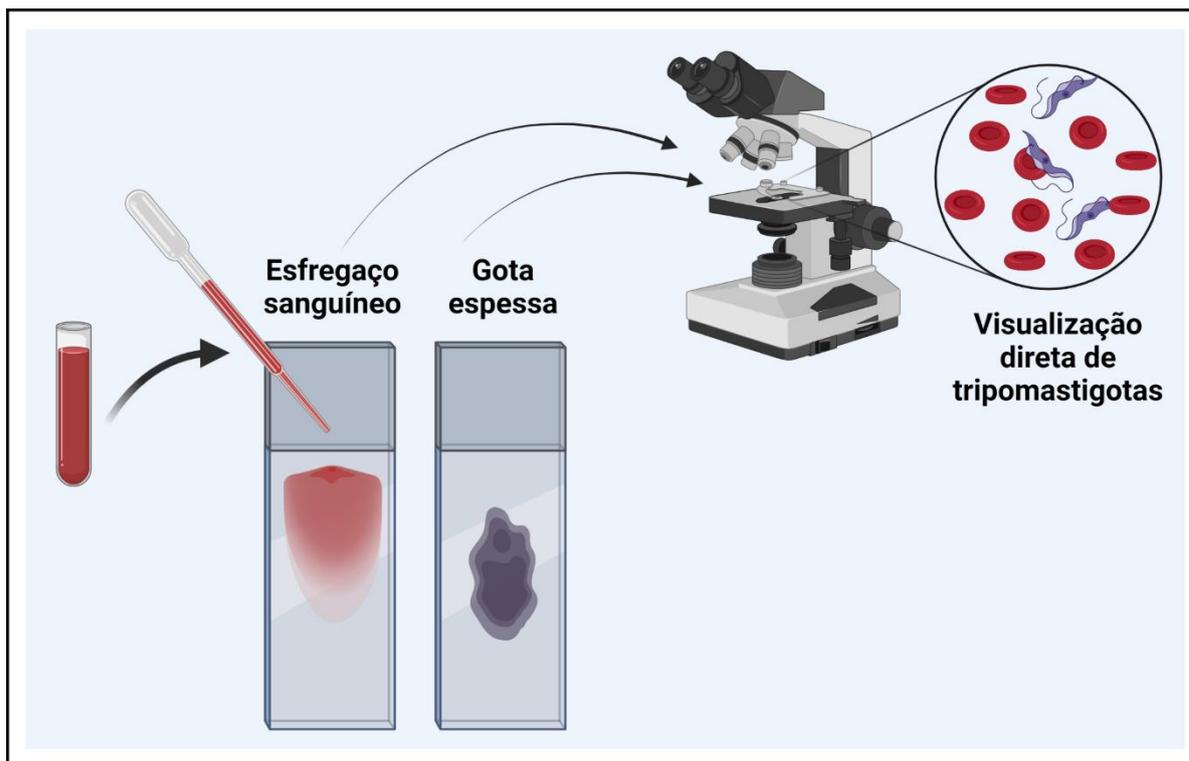


Figura 10: Desenho esquemático do esfregaço sanguíneo e exame de gota espessa para o diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda.

Fonte: acervo grupo SerdYtech.

2.6.2 Diagnóstico sorológico indireto

A fase crônica da DC é marcada por parasitemia subpatente e aumento dos títulos de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. Deste modo, as técnicas parasitológicas não são indicadas para esta fase, visto que não é mais possível visualizar facilmente os parasitos circulantes no sangue periférico. A PCR também não é o método mais indicado por conta da baixa sensibilidade relatada nesta fase, pois não há tripomastigotas circulantes para amplificação (DO BRASIL; CASTRO; DE CASTRO, 2016). Assim, os métodos sorológicos indiretos são adequados para o diagnóstico na fase crônica, sendo possível a pesquisa de anticorpos específicos no soro dos indivíduos infectados. Os métodos mais empregados são a hemaglutinação indireta (HAI), a imunocromatografia, a imunofluorescência indireta (IFI), o ELISA e a quimiluminescência (GOMES *et al.*, 2009).

A hemaglutinação indireta (HAI) (Figura 11) é um método que apresenta elevada especificidade, além de ser facilmente executado, levando em média 2 horas para ser realizado. Todavia, apesar da elevada especificidade, este método apresenta baixa sensibilidade e alto número de resultados inconclusivos (GADELHA *et al.*, 2003). Baseia-se na incubação de hemácias sensibilizadas com antígenos do *T. cruzi* e o material biológico dos

indivíduos suspeitos de infecção. Quando a amostra é reagentes, as hemácias se distribuem homogeneamente no fundo da placa. (BRASIL, 2016; MOREIRA; GOMES, 1998).

Na imunofluorescência indireta (IFI) (Figura 12), os anticorpos presentes no soro reagem com as formas epimastigotas fixadas em lâminas de vidro; após sucessivas lavagens, a lâmina é incubada com anticorpo anti-imunoglobulina humana conjugado à fluoresceína e lida em microscópio de fluorescência (LUQUETTI; SCHMUÑIS, 2017). Apresenta sensibilidade de 99% e pode levar a reações cruzadas com outros patógenos, principalmente com espécies do gênero *Leishmania* spp. Por conta disso, o seu uso em áreas de co-endemicidade é limitado (DALTRO *et al.*, 2019). Dentre outras desvantagens, este método demanda várias etapas, a leitura é subjetiva e deve ser feita por profissional qualificado, além da necessidade de microscópio de fluorescência.

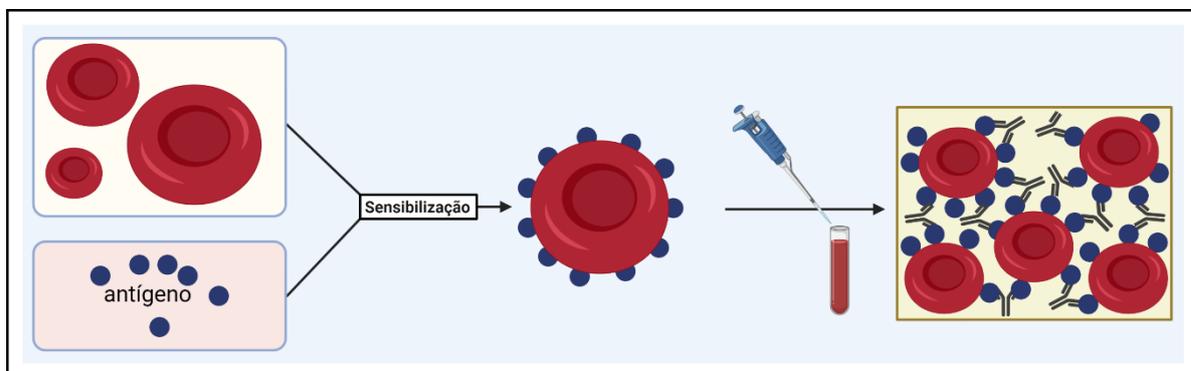


Figura 11: Representação esquemática de uma reação de hemaglutinação indireta (HAI) positiva.

Fonte: acervo grupo SerdYtech.

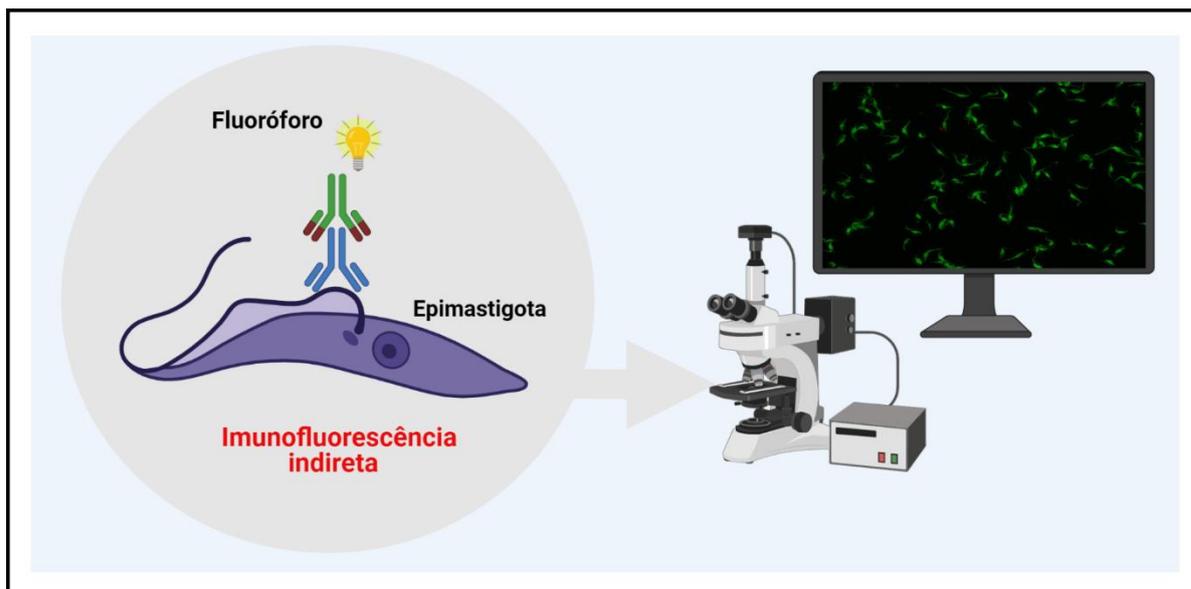


Figura 12: Representação esquemática de uma reação de imunofluorescência indireta (IFI).
Fonte: acervo grupo SerdYtech.

O ELISA (Figura 13) é o teste mais empregado para diagnóstico laboratorial da DC por ser mais simples, de fácil execução e passível de automação (GOMES *et al.*, 2009). É um teste imunoenzimático que se baseia na interação antígeno-anticorpo demonstrada pela ação de uma enzima e substrato apropriado. Como preparação antigênica podem ser utilizados: extrato bruto ou semi-purificado, proteínas recombinantes e proteínas recombinantes quiméricas.

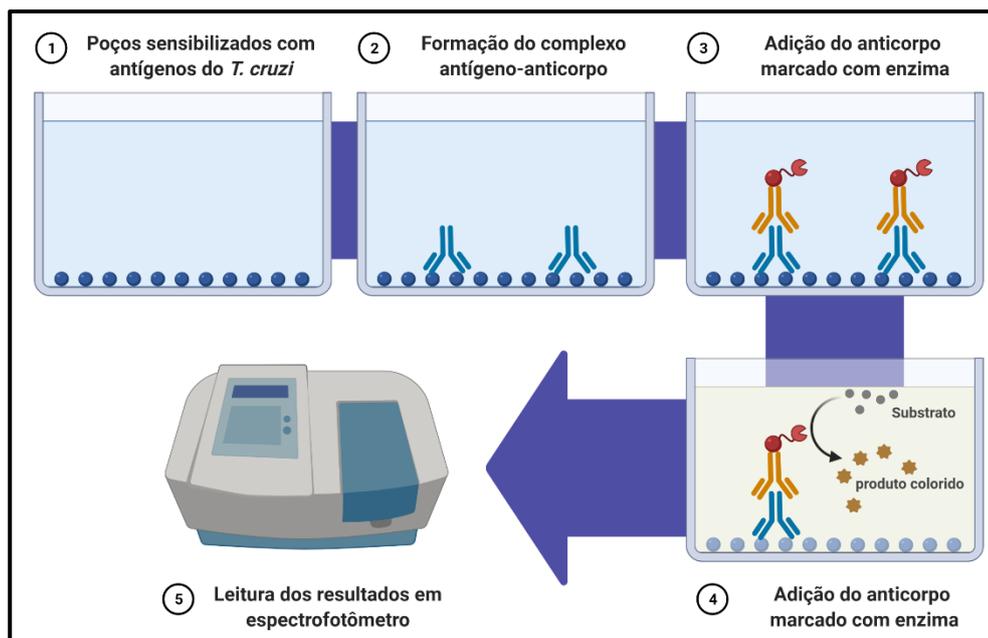


Figura 13: Representação esquemática do teste de ELISA.

Fonte: acervo grupo SerDYtech.

O extrato bruto ou semi-purificado empregado no ELISA advém da forma epimastigota do *T. cruzi*, estágio presente apenas no inseto e nas culturas a 26° C, mas ausente no hospedeiro humano. Estudos demonstram uma alta sensibilidade destes testes, porém há variação na reprodutibilidade por conta da mistura complexa e variável de antígenos, além de baixa especificidade devido à RC com espécies do gênero *Leishmania* spp. e *Trypanosoma rangeli*, protozoários filogeneticamente relacionados ao *T. cruzi*. (DALTRO *et al.*, 2019; LONGHI *et al.*, 2012; MARCIPAR *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2016a). Com o intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade do ELISA e diminuir os índices de RC, houve o desenvolvimento de proteínas recombinantes para utilização como matriz antigênica, apresentando elevação dos parâmetros de desempenho. Este tipo de preparação antigênica mostrou especificidade superior ao encontrado para os extratos, porém apresentou sensibilidade inferior. Além disso, altos índices de RC com *Leishmania* spp. continuaram a ser reportados quando os testes foram utilizados em áreas de co-endemicidade com a leishmaniose (CABALLERO *et al.*, 2007; DA SILVEIRA *et al.*, 2001; TELLES *et al.*, 2003; DALTRO *et al.*, 2019). Tendo em vista a perda de sensibilidade ao empregar proteínas recombinantes, alguns autores avaliaram ensaios com misturas de peptídeos, melhorando o desempenho dos testes (ALMEIDA *et al.*, 1990; UMEZAWA, *et al.*, 1999). Mais recentemente, o uso de proteínas multi-epítipo (quimeras) foi proposto para aumentar a sensibilidade.

As proteínas recombinantes quiméricas surgiram como alternativa ao uso dos extratos brutos e das proteínas recombinantes; são compostas por fragmentos repetidos e conservados de aminoácidos presentes em várias proteínas do parasito, melhorando a precisão dos ensaios no diagnóstico da infecção chagásica. São moléculas únicas, que facilitam a padronização, diminuindo as etapas de purificação e imobilização e equilibrando o número de epítomos na superfície das microplacas, apresentando, portanto, sensibilização homogênea (CAMUSSONE *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2017a). Desta forma, há um aumento do repertório de epítomos disponíveis para ligação com os anticorpos presentes no soro dos indivíduos infectados. A utilização deste tipo de preparação antigênica eleva a sensibilidade dos testes sem, contudo, reduzir a especificidade, pois podem ser sintetizados a partir de sequências que não apresentam homologia ou similaridade com epítomos de outros agentes infecciosos (PEVERENGO *et al.*, 2018).

Recentemente, nosso grupo expressou quatro proteínas quiméricas, denominadas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4, e o seu potencial diagnóstico foi avaliado em estudos de fase I, II e III (CORDEIRO *et al.*, 2020; DEL-REI *et al.*, 2019; DOPICO *et al.*, 2019; SANTOS, 2020; SANTOS *et al.*, 2016a, 2017a).

2.7 WESTERN BLOT

O *Western blot* (WB) é uma das técnicas laboratoriais mais comuns e robustas para a detecção imunológica de proteínas. Misturas complexas de proteínas são separadas por carga elétrica e peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida e, em seguida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A porcentagem de poliacrilamida usada no gel, juntamente com o tampão de corrida, influencia a mobilidade das proteínas através do gel à medida que a corrente é aplicada (Figura 14) (HNASKO, 2015). Posteriormente, a membrana é incubada com o soro de interesse. Após a incubação, anticorpos não ligados são removidos por lavagem, deixando apenas aqueles que se ligaram às proteínas alvo presentes na membrana. O anticorpo conjugado à peroxidase (HRP) é adicionado à membrana, formando uma ligação proteína-anticorpo-anticorpo-HRP que pode ser detectada por quimiluminescência (Figura 15). Um dispositivo de imagem revela a reação em forma de uma “banda” com um peso molecular específico. As bandas na membrana são comparadas com marcadores de peso molecular para determinar se a proteína de interesse está presente na amostra (HUBÁLEK, 2009; KIM, 2017; MAHMOOD; YANG, 2012).

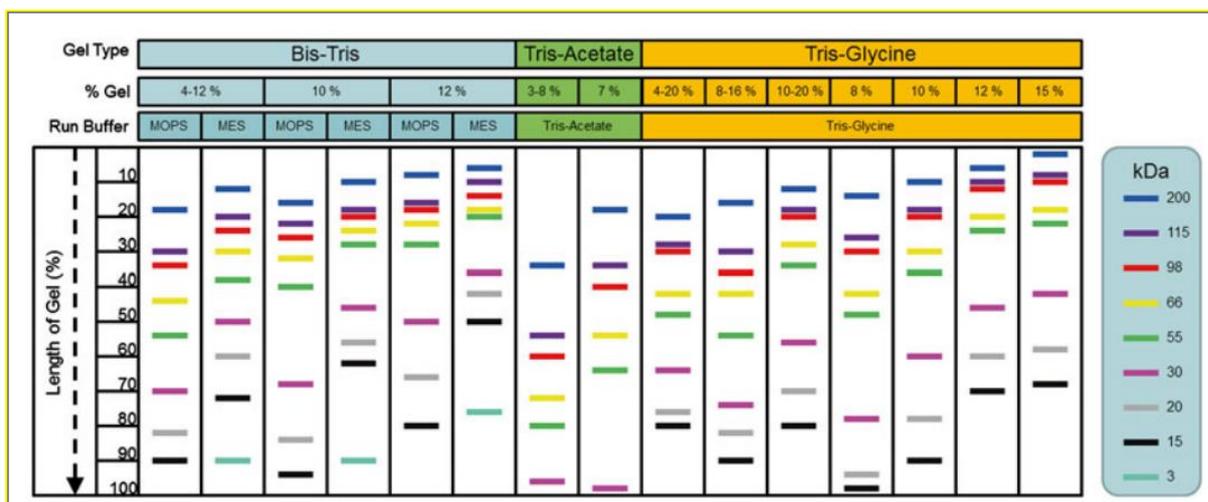


Figura 14: Desenho esquemático mostrando as porcentagens de poliacrilamida usadas no gel. **Nota:** A migração de proteínas por peso molecular varia de acordo com o tipo de gel, concentração e tampão de corrida.

Fonte: Hnasko *et al.* (2015).

O WB é considerado uma técnica confirmatória no diagnóstico de diversas enfermidades e pode ser empregado como teste confirmatório para a DC (ESCALANTE *et al.*, 2014). Diversos grupos de pesquisa investigaram a utilidade do WB no diagnóstico da DC para confirmar os resultados sorológicos obtidos nos testes convencionais utilizados e demonstraram altos índices de sensibilidade e especificidade (ARAUJO, 1986; MORGADO *et al.*, 1989; REICHE *et al.*, 1998).

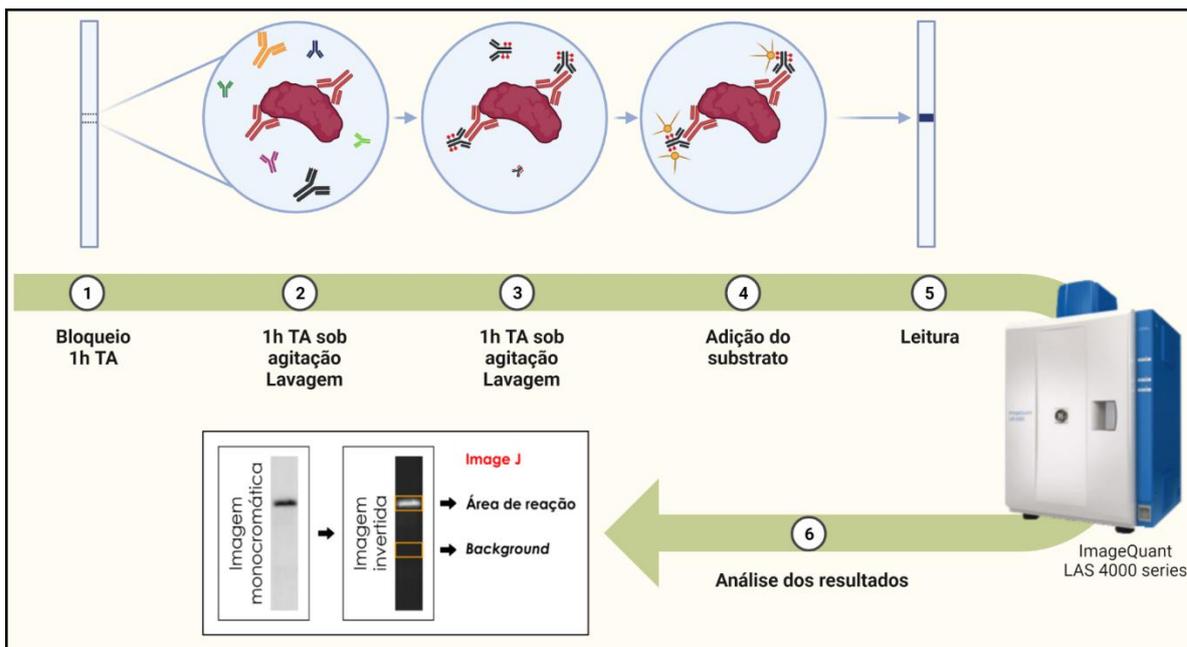


Figura 15: Representação esquemática do teste de *Western blot*.

Fonte: acervo grupo SerdYtech.

Não há atualmente um teste 100% sensível e específico para diagnosticar a DC e, por esta razão, a OMS preconiza a utilização de um teste de alta sensibilidade e um de alta especificidade ou dois testes com matrizes antigênicas distintas. Porém, ainda há relatos de resultados inconclusivos, e quando isso ocorre, o WB utilizando o antígeno excretado-secretado de tripomastigota (TESA) poderia ser empregado para definir a positividade ou negatividade da amostra (Figura 16) (OMS, 2007). O TESAcruzi foi anteriormente proposto como um teste de WB, mostrando uma sensibilidade tão alta quanto aquela encontrada nos testes que empregam antígenos recombinantes como matriz antigênica (SILVEIRA-LACERDA *et al.*, 2004). Todavia, a produção do TESAcruzi foi descontinuada pelo fabricante em 2016, deixando uma lacuna no diagnóstico confirmatório da DC.

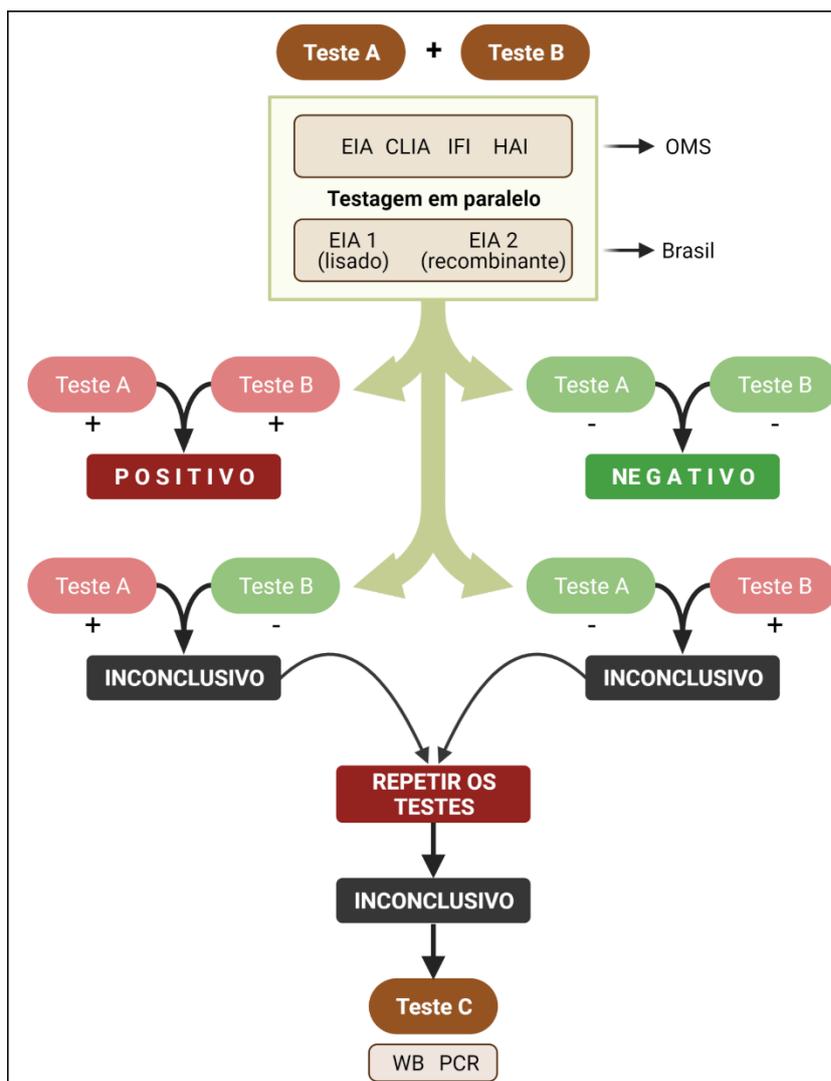


Figura 16: Fluxograma do diagnóstico sorológico para a detecção da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Legenda: CLIA: quimiluminescência; IFI: imunofluorescência indireta; HAI: hemaglutinação indireta; PCR: reação em cadeia da polimerase; WB: *Western blot*.

Fonte: acervo grupo SerDYtech.

2.8 ANTÍGENOS IBMP

Os antígenos recombinantes quiméricos denominados IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 (acrônimos para o Instituto de Biologia Molecular do Paraná) foram obtidos através de técnicas de engenharia genética pelo nosso grupo. Trata-se de quatro antígenos formados por sequências imunodominantes, conservadas e repetitivas de diversas proteínas do *T. cruzi* (Quadro 1). Estes antígenos foram padronizados para diagnóstico sorológico em humanos em estudos de fase I, II e III (DEL-REI *et al.*, 2019; DOPICO *et al.*, 2019; SANTOS, 2020; SANTOS *et al.*, 2016b, 2017a, 2018), e também foram avaliados para detecção de

anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em cães (LEONY *et al.*, 2019). As moléculas IBMP são constituídas por sequências escolhidas na literatura (SANTOS *et al.*, 2016b). O detalhamento das sequências e a obtenção destas proteínas encontram-se em sigilo devido ao pedido de depósito de patente (BR 10 2018 016140 7) realizado no ano de 2018.

Quadro 1: Composição dos antígenos recombinantes quiméricos IBMP.

IBMP	Segmentos	Denominação	Peso molecular (kDa)
8.1	SAPA RPL19 Ag2/B13/CA-2	Antígeno de fase aguda/Trans-sialidase Proteína L19 de subunidade ribossomal 60S Proteínas de superfície de tripomastigota	17
8.2	Ag1/H49/JL7 SAPA Ag2/B13/CA-2	Proteínas associadas ao citoesqueleto Antígeno de fase aguda/Trans-sialidase Proteínas de superfície de tripomastigota	36
8.3	Ag2/B13/CA-2 CRA/JL8/Ag30 TcD RPL19	Proteínas de superfície de tripomastigota Antígenos repetitivos citoplasmático Trans-sialidase Proteína L19 de subunidade ribossomal 60S	30
8.4	SAPA RPL19 Ag2/B13/CA-2 FRA MAP KMP-11	Antígeno de fase aguda/Trans-sialidase Proteína L19 de subunidade ribossomal 60S Proteínas de superfície de tripomastigota Proteína de antígeno repetitivo flagelar Proteína associada ao microtúbulo Proteína da membrana do cinetoplasto	45

Fonte: Modificado de Santos *et al.* (2016).

O estudo de fase I foi realizado através do ELISA e do microarranjo líquido como plataformas diagnósticas, empregando os quatro antígenos recombinantes quiméricos IBMP. Foram utilizadas 280 amostras séricas positivas e 20 negativas para a DC, sendo possível observar que as quatro moléculas diferenciaram indivíduos negativos de positivos para DC crônica, com valores de AUC superiores a 98% (SANTOS *et al.*, 2016b). Desta maneira, todas as moléculas foram elegíveis para compor o estudo de fase II, o qual tem como alvo a determinação dos parâmetros de desempenho (sensibilidade, especificidade e acurácia) para um quantitativo amostral estatisticamente calculado usando amostras representativas do agravo. Respeitando estas características, foram utilizadas 857 amostras reativas para DC crônica e 689 não reativas, além de 1.079 amostras reativas para outras doenças infecto-parasitárias para avaliação da reatividade cruzada. As amostras foram provenientes de diversos estados brasileiros, bem como de painéis comerciais internacionais. Como resultado, as proteínas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 apresentaram sensibilidade de 97,4%, 94,3%, 97,9% e 99,3% e especificidade de 99,4%, 99,6%, 99,9% e 100%, respectivamente. Neste estudo, foi observado que o desempenho diagnóstico das moléculas

foi superior ao dos testes comerciais disponíveis no Brasil, com baixo quantitativo de RC e elevada reprodutibilidade intra-teste, inter-teste e inter-laboratorial (SANTOS *et al.*, 2017a). As proteínas quiméricas também foram analisadas pelo microarranjo líquido (LMA) com um painel sorológico de 1.333 soros positivos e negativos para DC e 851 soros positivos para outras doenças infecto-parasitárias. Os resultados encontrados com o LMA foram semelhantes àqueles encontrados no ELISA (SANTOS *et al.*, 2017b). Além do ELISA e do LMA, houve a análise com o método de imunocromatografia de duplo percurso (DPP; *dual path platform*) (SILVA, 2016) e de fluxo lateral (LFA; *lateral flow assay*) (SILVA *et al.*, 2020), demonstrando resultados semelhantes aos obtidos anteriormente. Adicionalmente, os antígenos foram avaliados para diagnóstico utilizando amostras séricas humanas de indivíduos de outros países, sendo possível a análise do comportamento destas moléculas com outras DTUs do *T. cruzi*, tanto em áreas endêmicas quanto não endêmicas. Para essas análises, foram empregadas as moléculas IBMP-8.1 e IBMP-8.4, já que ambas apresentaram os maiores valores de acurácia dentre as quatro no DPP. Na avaliação realizada em áreas endêmicas, as amostras séricas dos indivíduos positivos e negativos para DC foram provenientes de distintas localidades da Argentina, Bolívia e Paraguai (DEL-REI *et al.*, 2019). Já no estudo conduzido em áreas de baixa endemicidade, foram utilizadas amostras séricas de imigrantes latino-americanos residentes em Barcelona (DOPICO *et al.*, 2019). Em ambas as situações, o desempenho diagnóstico dos antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 manteve-se elevado, sendo, inclusive, semelhante ao reportado em estudos prévios (fase II) conduzidos no Brasil (SANTOS *et al.*, 2017a; SANTOS *et al.*, 2017b; SILVA, 2016). Amostras séricas de indivíduos advindos de áreas de co-endemicidade com espécies do gênero *Leishmania* spp. também foram empregadas em um estudo conduzido em 2019 (DALTRO *et al.*, 2019), resultando em baixos índices de reatividade cruzada para todas as quatro moléculas. Desta forma, é evidente que as proteínas recombinantes quiméricas IBMP conseguem diagnosticar a DC independentemente da cepa infectante, mesmo com a grande variabilidade antigênica observada para o *T. cruzi*.

As amostras séricas utilizadas nos estudos de fase I e II citados acima foram classificadas seguindo as recomendações da OMS, contudo, testes comerciais podem fornecer resultados incoerentes ou inconclusivos. Tendo em vista esta situação, em 2018, a análise de classe latente (LCA) foi avaliada como teste de referência (padrão-ouro) para classificar as amostras como positivas e negativas para DC (SANTOS *et al.*, 2018). A LCA é uma ferramenta estatística utilizada para avaliar novos testes na ausência de um padrão-ouro. A presença da doença é desconhecida, porém, com esta abordagem, é possível obter uma

aproximação do seu estado real. Assim, a probabilidade de uma dada combinação de resultados ou testes produz um padrão de classe latente, isto é, o *status* de doença, se presente ou ausente (KONGSTED, A; NIELSEN, A.M., 2016). Neste estudo, os antígenos IBMP foram empregados no diagnóstico das amostras individualmente e a análise combinada dos resultados definiu as amostras como positivas ou negativas. Uma amostra foi definida como positiva quando reagia em no mínimo duas moléculas e foi negativa quando apresentava reatividade para somente uma molécula ou nenhuma delas, como mostra a figura abaixo (Figura 17).

ELISA	P1	P2				P3						P4				P5
IBMP-8.1	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
IBMP-8.2	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
IBMP-8.3	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
IBMP-8.4	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
LCS	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
PP %	0	0.3	0.1	0.3	0.8	90	97	99	88	96	99	100	100	100	100	100

Figura 17: Padrões de resposta de classe latente e probabilidade à posteriori dos antígenos IBMP para o diagnóstico preciso da DC crônica.

Nota: As amostras foram agrupadas nas categorias P1 – P5 de acordo com o padrão de resposta do ensaio de ELISA.

Legenda: LCS (status da classe latente). NEG (negativo). POS (positivo). PP (probabilidade à posteriori).

Fonte: Santos *et al.* (2018).

A partir do estabelecimento da LCA como padrão-ouro, esta abordagem foi utilizada como teste de referência em um estudo realizado para avaliar a reatividade cruzada dos antígenos IBMP em áreas de co-endemicidade com *Leishmania* spp. Neste estudo, o quantitativo amostral foi de 629 amostras positivas para leishmaniose tegumentar e 200 para leishmaniose visceral. Foi verificado que 82 (9,9%) amostras foram excluídas do estudo, já que a LCA indicou que eram co-infectadas com o *T. cruzi*. Se, ao invés da LCA, fosse utilizado o preconizado pela OMS (dois testes comerciais com preparações antigênicas distintas), 533 (64,3%) amostras seriam excluídas do estudo, sendo este quantitativo definido como falso-positivo. Os índices de RC foram baixos para todas as proteínas IBMP, especialmente para IBMP-8.4, que não apresentou RC com nenhuma amostra (DALTRO *et al.*, 2019). Com base

nos resultados obtidos usando os antígenos IBMP, avaliaremos o desempenho diagnóstico destas moléculas utilizando o *Western blot*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho diagnóstico dos antígenos recombinantes quiméricos do *Trypanosoma cruzi* (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4) como matrizes antigênicas utilizando a plataforma de *Western blot* no diagnóstico da doença de Chagas crônica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar os ensaios de *Western blot* utilizando os antígenos quiméricos IBMP;
- Validar o ensaio de *Western blot* utilizando os antígenos quiméricos IBMP com um painel de soros de indivíduos infectados e não infectados pelo *T. cruzi*;
- Avaliar a reatividade cruzada dos antígenos recombinantes quiméricos IBMP frente ao soro de indivíduos com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral utilizando o *Western blot*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de uma padronização e validação de método diagnóstico. O objetivo principal deste tipo de estudo é avaliar se o teste é funcional ou não (estudo de fase I ou prova de conceito), sendo comumente realizado utilizando amostras bem caracterizadas de indivíduos positivos e negativos para o agravo em questão (SACKETT; HAYNES, 2002). Para esta finalidade, são calculados parâmetros de sensibilidade e especificidade e esses valores são comparados com o padrão-ouro (BANO *et al.*, 2006).

4.2 LOCAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E PROCEDIMENTOS

Os processos de obtenção e purificação dos antígenos IBMP foram realizados por colaboradores do Laboratório de Genômica de Proteínas (Instituto Carlos Chagas, ICC/FIOCRUZ-PR). A transferência dos antígenos para as membranas de nitrocelulose foi realizada no Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular (LAPEM, Instituto Gonçalo Moniz, IGM/FIOCRUZ-BA). A avaliação do potencial diagnóstico da técnica foi realizada no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP, Instituto Gonçalo Moniz, IGM/FIOCRUZ-BA). A aquisição das imagens foi realizada no Laboratório de Inflamação e Biomarcadores (LIB, Instituto Gonçalo Moniz, IGM/FIOCRUZ-BA).

4.3 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Conforme mencionado anteriormente, os antígenos foram expressos e purificados em colaboração com o Instituto Carlos Chagas (ICC - Fiocruz-PR). Detalhes da obtenção podem ser verificados em Santos *et al.* (2017a). Resumidamente, os antígenos foram clonados em vetor pET28a e expressos em *Escherichia coli* BL21-Star. Após indução, as bactérias foram lisadas e o homogenato contendo as proteínas foi separado por centrifugação para a purificação, a qual foi realizada por meio de cromatografia de troca iônica e de afinidade.

4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)

A separação das proteínas em função de seus pesos moleculares e carga elétrica foi conduzida através da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, sendo realizada utilizando géis de concentração e de separação. Neste procedimento, os géis foram preparados

a uma concentração de acrilamida de 15% e 5%, respectivamente. A solução correspondente ao gel de separação foi depositada entre as placas até 2,5 cm abaixo da borda superior para a placa de 10 x 10 cm, colocando em seguida uma fina camada de água destilada. Após polimerização, a água destilada foi removida e a solução do gel de concentração foi depositada. O pente marcador composto por 2 dentes (largura de 0,5 e 8 cm) ou por 10 dentes (largura de 0,5 cm com 1 mm de espessura) foi colocado imediatamente, sendo removido após polimerização e a placa ajustada em uma cuba vertical.

Para determinação das condições ótimas do ensaio, foram avaliadas diferentes diluições dos antígenos, das amostras séricas e do anticorpo secundário conjugado à peroxidase através de *checkerboard titration*. Este método objetiva identificar as condições que melhor diferenciam amostras positivas das negativas. Para a padronização, os antígenos foram diluídos em tampão da amostra e água destilada nas quantidades finais de 50, 25, 12,5, 10 e 2 ng, colocados em água fervente durante 5 minutos e depositados em cada poço do gel. A eletroforese foi realizada mantendo uma corrente constante 15 mA até o término da corrida.

Tabela 1: Composição dos géis de separação e de concentração em SDS-PAGE.

Soluções	Gel de separação (15%)	Gel de concentração (5%)
Água destilada	1,2 ml	2,04 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,3 ml	-
Tris-HCl 1,0 M pH 6,8	-	0,375 ml
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	2,5 ml	0,51 ml
SDS 10%	50 µl	30 µl
Persulfato de Amônia 10%	50 µl	30 µl
TEMED	2µl	3 µl

4.5 TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS PARA A MEMBRANA DE NITROCELULOSE (NTC)

Nesta etapa foi realizada a transferência das proteínas presentes no gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose. Para esta finalidade, foi feito um “sanduíche”, como esquematicamente demonstrado na Figura 18. O sanduíche foi formado em um sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot SD System, Bio-Rad Laboratories, EUA) e as camadas foram embebidas no tampão de transferência de Towbin (Tris base 5,8 g, glicina 2,9 g, SDS 0,37 g, metanol 200 ml, água destilada 800 ml). Uma corrente constante de 20V foi aplicada durante 1 h. Para verificar a eficiência da transferência, a membrana de NTC (Amersham Protran NC Nitrocellulose Membrane, GE *Healthcare*, EUA) foi corada com Ponceau (Sigma *Diagnostics*, EUA).

Após lavagem com água destilada para retirada do excesso do corante, a membrana de NTC foi incubada na solução de bloqueio (PBS-Tween a 0,05%, leite desnatado a 5%) por 1 h em temperatura ambiente, sob agitação. Para padronização dos imunoenaios, foram utilizadas amostras humanas previamente caracterizadas como positivas ou negativas para a DC, sendo duas delas positivas e uma negativa, com diluição sérica de 1:100. Após incubação por 1 h em temperatura ambiente, foram realizadas 3 lavagens com PBS-Tween a 0,05% por 5 minutos cada. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 h com a anti-globulina humana (anti-IgG) conjugada à peroxidase diluída 1:2.000 em PBS-Tween a 0,05% e leite desnatado a 5%. Após novas etapas de lavagens, foi realizada a incubação com Pierce™ ECL *Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, EUA) e a leitura para detecção das bandas foi realizada no *ImageQuant LAS 4000 series* (General Electric, Boston, Massachusetts, EUA). As imagens foram salvas no formato “tif”.

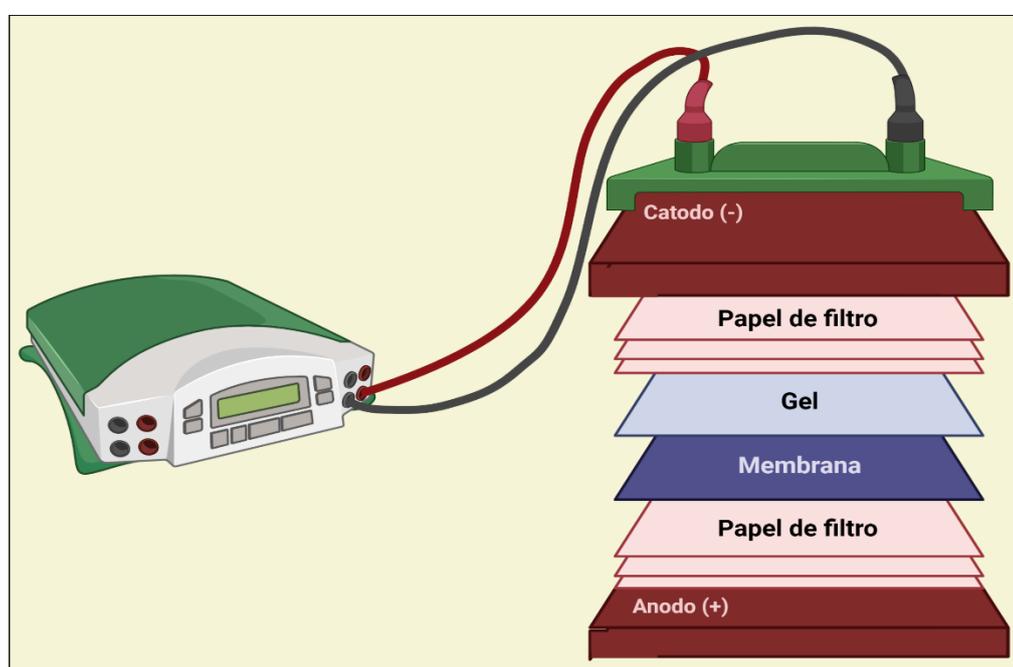


Figura 18: Representação esquemática da transferência no sistema semi-seco.
Fonte: acervo grupo SerdYtech.

4.6 DOT-BLOT PARA PADRONIZAÇÃO DO SORO E ANTICORPO SECUNDÁRIO

A técnica de *Dot-Blot* foi realizada para determinar as quantidades ótimas das amostras séricas e do anticorpo conjugado. Duas membranas de NTC (Amersham Protran NC Nitrocellulose Membrane, GE Healthcare, EUA) foram impregnadas utilizando o *Bio-Dot*® *Microfiltration System* (Bio-Rad Laboratories, Hércules, Califórnia, EUA). Uma das

membranas foi impregnada com soro humano positivo para a DC; a outra foi impregnada com anticorpo secundário, em ambas as situações foram utilizadas diferentes diluições de soro e anticorpo secundário. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente numa solução de PBS-Tween 0,05% e leite desnatado a 5%. Após bloqueio, foram lavadas três vezes durante 5 minutos cada. A membrana impregnada com soro foi incubada com o anticorpo secundário na diluição 1:4.000 por 1 h e subsequentemente lavada como citado anteriormente. A solução reveladora Pierce™ ECL *Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, EUA) foi adicionada e a leitura para detecção das bandas foi realizada no *ImageQuant LAS 4000 series* (General Electric, Boston, Massachusetts, EUA). As imagens foram salvas no formato “tif”.

4.7 PAINEL SOROLÓGICO

4.7.1 Dimensionamento amostral

Por ser um estudo de validação de métodos (fase I), não é necessária a determinação estatística para dimensionamento amostral, sendo a amostragem, portanto, de conveniência (SANTOS *et al.*, 2016b). Todavia, foram utilizadas amostras representativas do agravo em questão, ou seja, amostras de indivíduos residentes em diferentes regiões geográficas do Brasil (Alagoas, Amapá, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraíba e Pernambuco) e com variadas formas clínicas da DC crônica (indeterminada, cardíaca e mista) (Figura 19). A seleção da amostra foi baseada na negatividade ou positividade por dois testes sorológicos para DC: ELISA Chagas III (BIOSChile, Ingeniería Genética SA, Santiago, Chile), Imuno-ELISA Chagas (Wama Diagnóstica, São Paulo, Brasil), Gold ELISA Chagas (REM Diagnóstica, São Paulo, Brasil) ou Liaison XL Murex Chagas (DiaSorin, Saluggia, Itália). Foram excluídas as amostras com resultados divergentes entre os dois testes ou julgadas inconclusivas em um deles. Cada amostra recebeu um código numérico no laboratório para garantir uma análise cega.

4.7.2 Obtenção e caracterização do painel sorológico

Um total de 49 amostras foi utilizado neste estudo (Figura 19). As amostras positivas (n = 22) foram oriundas dos estados de Alagoas, Amapá, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, além de duas amostras advindas da OMS (IS 09/188 → DTU 1 e IS 09/186 → DTU 2). Trata-se de padrões biológicos internacionais disponibilizados pela OMS para avaliação de testes diagnósticos para a DC crônica (OMS, 2007). Foram incluídas amostras

com as diferentes formas clínicas da DC: cardíaca, mista e indeterminada. As amostras negativas (n = 24) foram provenientes de áreas endêmicas da Bahia, Goiás, Minas Gerais e Pernambuco. Para a padronização dos imunoenaios foram utilizadas duas amostras positivas e uma negativa para a DC, provenientes do estado da Bahia. Adicionalmente, três amostras positivas para leishmaniose visceral, oriundas do Rio Grande do Norte, foram incluídas para avaliação da reatividade cruzada. Todas as amostras foram recharacterizadas em nosso laboratório quanto a presença ou ausência de anticorpos anti-*T. cruzi* usando a classe latente como teste de referência (SANTOS *et al.*, 2018). Os resultados da recharacterização encontram-se disponíveis na Tabela 2.



Figura 19: Representação esquemática do painel amostral do estudo.

Fonte: a autora.

Tabela 2: Recaracterização das amostras usadas para a padronização dos imunoenaios, estudo de Fase I e reatividade cruzada.

Amostra	Origem	Finalidade	Clínica	ELISA indireto (IR)				LCA
				8.1	8.2	8.3	8.4	
NEG-01	BA	FASE I	-	0,48	0,23	0,32	0,19	NEG
NEG-02	BA	FASE I	-	0,47	0,41	0,15	0,22	NEG
NEG-03	BA	FASE I	-	0,46	0,31	0,20	0,16	NEG
NEG-04	BA	FASE I	-	0,59	0,40	0,35	0,28	NEG
NEG-05	BA	FASE I	-	0,18	0,28	0,18	0,12	NEG
NEG-06	BA	FASE I	-	0,34	0,29	0,22	0,15	NEG

NEG-07	BA	FASE I	-	0,23	0,13	0,07	0,15	NEG
NEG-08	BA	FASE I	-	0,24	0,17	0,13	0,15	NEG
NEG-09	GO	FASE I	-	0,44	0,31	0,13	0,10	NEG
NEG-10	GO	FASE I	-	0,51	0,45	0,31	0,14	NEG
NEG-11	GO	FASE I	-	0,70	0,56	0,81	0,77	NEG
NEG-12	GO	FASE I	-	0,11	0,12	0,06	0,11	NEG
NEG-13	MG	FASE I	-	0,66	0,54	0,34	0,53	NEG
NEG-14	MG	FASE I	-	0,52	0,29	0,18	0,31	NEG
NEG-15	MG	FASE I	-	0,32	0,53	0,23	0,78	NEG
NEG-16	MG	FASE I	-	0,66	0,54	0,34	0,53	NEG
NEG-17	MG	FASE I	-	0,30	0,29	0,13	0,26	NEG
NEG-18	MG	FASE I	-	0,42	0,50	0,17	0,32	NEG
NEG-19	MG	FASE I	-	0,32	0,53	0,23	0,78	NEG
NEG-20	PE	FASE I	-	0,10	0,19	0,08	0,09	NEG
NEG-21	PE	FASE I	-	0,20	0,49	0,18	0,18	NEG
NEG-22	PE	FASE I	-	0,54	0,60	0,22	0,37	NEG
NEG-23	PE	FASE I	-	0,23	0,23	0,21	0,17	NEG
NEG-24	PE	FASE I	-	0,19	0,50	0,57	0,30	NEG
IS 09/186	Brasil	FASE I	IND	1,16	1,85	1,14	1,25	POS
IS 09/188	México	FASE I	IND	1,13	2,07	1,11	1,20	POS
POS-01	AL	FASE I	IND	1,02	0,93	1,92	1,54	POS
POS-02	AP	FASE I	IND	1,79	1,20	1,27	2,07	POS
POS-03	BA	FASE I	CAR	4,95	2,99	4,11	2,74	POS
POS-04	BA	FASE I	CAR	1,02	1,29	2,48	1,69	POS
POS-05	BA	FASE I	MIS	4,28	4,52	3,63	4,39	POS
POS-06	BA	FASE I	MIS	5,95	4,85	4,80	5,11	POS
POS-07	BA	FASE I	CAR	5,70	3,17	4,32	2,77	POS
POS-08	GO	FASE I	MIS	0,96	3,40	2,55	2,24	POS
POS-09	GO	FASE I	MIS	6,71	3,24	3,33	3,10	POS
POS-10	MG	FASE I	MIS	2,77	1,64	0,38	2,44	POS
POS-11	MG	FASE I	CAR	3,08	3,36	0,99	2,71	POS
POS-12	MG	FASE I	CAR	5,93	6,97	2,76	4,90	POS
POS-13	MG	FASE I	CAR	4,51	1,44	1,34	1,98	POS
POS-14	PB	FASE I	CAR	5,93	6,38	1,77	3,91	POS
POS-15	PE	FASE I	IND	5,01	5,42	2,72	3,31	POS
POS-16	PE	FASE I	IND	2,23	1,37	2,47	1,93	POS
POS-17	PE	FASE I	IND	2,24	2,16	0,66	1,78	POS
POS-18	PE	FASE I	IND	4,07	4,99	2,61	3,30	POS
POS-19	PE	FASE I	IND	4,21	3,76	2,12	2,89	POS
POS-20	PE	FASE I	CAR	3,91	3,77	0,92	2,57	POS
LV-01	RN	RC	-	0,60	0,83	0,51	0,52	NEG
LV-02	RN	RC	-	0,74	1,16	0,63	0,61	NEG
LV-03	RN	RC	-	0,97	1,04	0,62	0,70	NEG
POS-01-P	BA	PADRON	-	4,14	3,54	1,83	3,13	POS
POS-02-P	BA	PADRON	-	4,58	4,01	3,44	3,42	POS
NEG-01-P	BA	PADRON	-	0,23	0,27	0,23	0,26	NEG

Legenda: AL (Alagoas); AP (Amapá); BA (Bahia); CAR (Cardíaca); GO (Goiás); IND (Indeterminada); IR (Índice de reatividade); LCA (Análise de classe latente); MG (Minas Gerais); MIS (Mista); NEG (Negativa); PADRON (Padronização); PB (Paraíba); PE (Pernambuco); POS (Positiva); RC (Reatividade cruzada); RN (Rio Grande do Norte).

Fonte: a autora.

4.7.3 Critérios de inclusão

Foram incluídas neste estudo amostras séricas de indivíduos acometidos pela DC, em suas diferentes formas clínicas (indeterminada, cardíaca e mista) e negativas para a DC, com recaracterização sorológica realizada pela análise de classe latente, bem como amostras séricas de indivíduos positivos para leishmaniose visceral, mas negativas para a DC pela classe latente.

4.7.4 Critérios de exclusão

Amostras com volumes inferiores a 200 µl e que não foram submetidas à recaracterização sorológica por meio da análise de classe latente.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo está inserido no projeto “Avaliação e validação do potencial diagnóstico de proteínas recombinantes para detecção de patógenos investigados pela Hemorrede do Brasil e pela triagem pré-natal do SUS” (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz/BA; CAAE 67809417.0.0000.0040).

4.9 EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO

4.9.1 Análise das imagens

As imagens das membranas foram capturadas pelo *ImageQuant LAS 4000 series* (General Electric, Boston, Massachusetts, EUA) após 30 segundos de exposição à luz produzida na reação de quimiluminescência. As imagens foram obtidas no formato monocromático e em cores invertidas, sendo salvas na extensão “tiff” (Figura 20). A intensidade de coloração, denominada intensidade relativa de banda (RBI; *Relative Band Intensity*) nas áreas de interesse (áreas de reação) foi mensurada utilizando seleção retangular na barra de menus do *Image J* (*National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, EUA) (SCHNEIDER *et al*, 2012). Para cada membrana, foi também mensurada a intensidade de cor em regiões onde não houve reação, visando estabelecer o branco (*background*) por amostra analisada. Com objetivo de minimizar viés de leitura, a mesma área retangular foi aplicada a todas as imagens adquiridas (Figura 20).

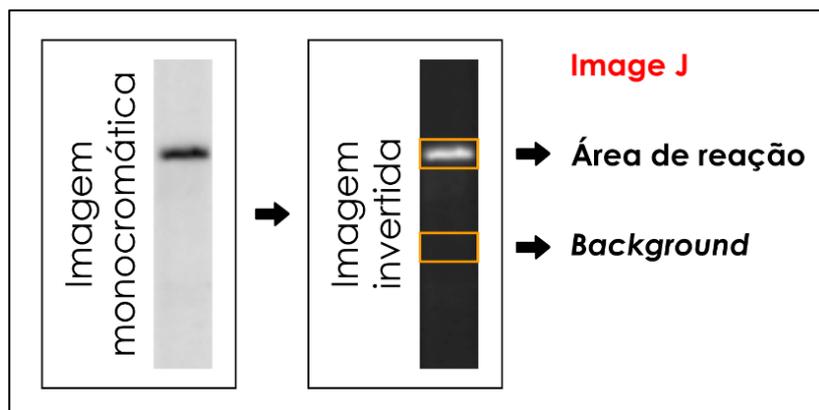


Figura 20: Imagens obtidas no ImageQuant LAS 4000 para mensuração da intensidade de cor nas áreas de reação e *background*, usando o *software* Image J.

Nota: Áreas em laranja representam as seleções retangulares usadas para mensuração da intensidade de cor.

Fonte: A autora.

4.9.2 Análise estatística

As intensidades relativas das bandas (RBI) foram adquiridas através do *Image J* e analisadas usando o *software* *GraphPad Prism* versão 8 (San Diego-CA, USA). A estatística descritiva foi apresentada como média geométrica \pm desvio padrão (DP). O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados. Quando a homogeneidade assumida foi confirmada, foi utilizado o teste T de Student. Caso contrário, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Todas as análises foram bicaudais e um valor de p inferior a 5% ($p < 0,05$) foi considerado significativo. Os pontos de corte foram estabelecidos pela determinação da maior área sob a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), que foi empregada para estabelecer um RBI máximo para distinguir amostras positivas e negativas de *T. cruzi*. As áreas abaixo da curva ROC (AUC) foram consideradas para avaliar a precisão global de cada proteína IBMP, cujos valores podem ser classificados como baixos (0,51-0,61), moderados (0,62-0,81), elevados (0,82-0,99) ou excelentes (1,0) (SWETS, 1988). Os parâmetros de desempenho, como sensibilidade, especificidade e acurácia, foram determinados usando uma tabela de dupla entrada. Os intervalos de confiança a 95% (IC95%) foram calculados para abordar a precisão das estimativas de proporção dos parâmetros de desempenho. A análise *Kappa* de Cohen (κ) foi empregada para determinar a concordância entre os resultados da análise de classe latente e aqueles obtidos através do WB-IBMP, sendo interpretado como baixa concordância ($\kappa = 0$), concordância leve ($0,20 \leq \kappa < 0,40$), concordância justa ($0,40 \leq \kappa < 0,60$), concordância moderada ($0,60 \leq \kappa < 0,80$), concordância substancial ($0,80 \leq \kappa < 1,0$), concordância excelente ($\kappa = 1,0$) (Cohen, 1988).

concordância quase perfeita ($1,0 \leq \kappa \geq 0,81$) e concordância perfeita ($\kappa = 1,0$) (LANDIS; KOCH, 1977).

5 RESULTADOS

5.1 SDS-PAGE DOS ANTÍGENOS IBMP

Na análise dos antígenos IBMP através do SDS-PAGE foi possível observar bandas distintas e conservadas, na ausência de degradação (Figura 21).

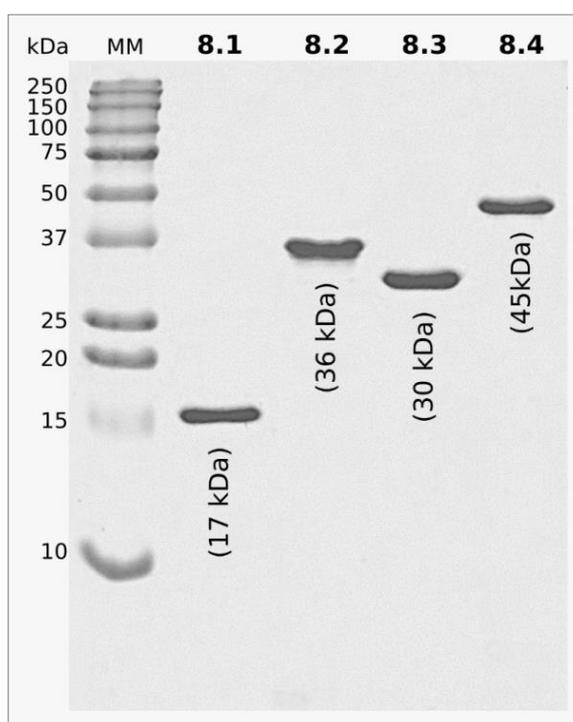


Figura 21: SDS-PAGE dos antígenos IBMP corados pelo azul de Coomassie com 1 µg de antígeno distribuído por poço.

Legenda: kDa (quilodaltons); PM (peso molecular).

Fonte: a autora.

5.2 PAINÉIS SOROLÓGICOS

5.2.1 Recaracterização sorológica

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram previamente submetidas à análise de classe latente considerando os resultados obtidos em ensaios de ELISA indireto utilizando os quatro antígenos quiméricos IBMP (Tabela 2). Todas as amostras negativas apresentaram índice de reatividade inferior a 1,00. Em relação às amostras positivas, 16 foram positivas para todos os ensaios IBMP-ELISA. Estes dados indicam uma probabilidade à posteriori de 100% da classificação sorológica pela LCA estar correta. Para seis amostras positivas, quatro delas apresentaram resultado negativo para molécula IBMP-8.3, uma para a IBMP-8.2 e uma

para a IBMP-8.1. Todavia, a probabilidade à posteriori destas amostras serem classificadas como positivas para a DC pela LCA também é de 100%. Para as amostras positivas para leishmaniose visceral, a probabilidade à posteriori de serem negativas para a DC é de 100%, visto que todas elas apresentam índice de reatividade inferior a 1,00. Com base nos resultados obtidos, todas as amostras elegíveis para a realização do estudo encontram-se aptas para serem usadas nos ensaios de WB, tanto nas avaliações de fase I quanto na análise de reatividade cruzada.

5.2.2 Padronização do WB

Para determinar as condições ótimas do ensaio, foram avaliadas diferentes diluições dos antígenos, das amostras séricas e do anticorpo secundário através de *checkerboard titration*. Esse método objetivou identificar as condições que melhor diferenciam amostras positivas das negativas. O antígeno IBMP-8.4 foi o primeiro a ser padronizado, pois apresentou o melhor desempenho nos estudos realizados anteriormente (SANTOS *et al.*, 2017a; SANTOS *et al.*, 2017b; DEL-REI *et al.*, 2019; DOPICO *et al.*, 2019). Inicialmente, foi testadas as diluições de 100, 200, 400, 800, 1.600, 3.200 e 6.400 vezes. Para esta finalidade foi usada a amostra POS-02-P (Tabela 2). O conjugado foi utilizado na proporção de 1:4.000 e o tempo de exposição à luz produzida na reação de quimiluminescência foi de 30 segundos. Conforme demonstrado na Figura 22, a diluição sérica que apresentou o maior sinal de quimiluminescência foi a de 100 vezes. Portanto, a diluição de 1:100 foi adotada para as demais etapas de padronização da técnica de WB.

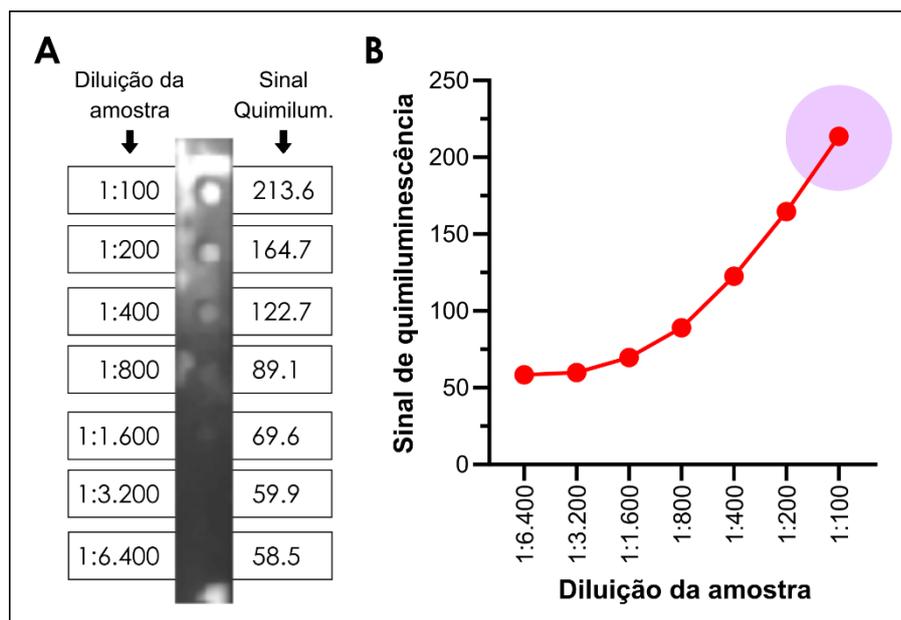


Figura 22: Avaliação da diluição da amostra por *Dot-Blot*.

Legenda: Imagem invertida da membrana de *Dot-Blot* (A); Análise gráfica mostrando a diluição de escolha (círculo lilás).

Nota: A escolha do ponto de diluição baseou-se no maior sinal de quimiluminescência.

Fonte: a autora.

Uma vez estabelecida a diluição das amostras em 1:100, foi realizado um novo ensaio de *Dot-Blot* para a definição da melhor diluição do anticorpo secundário. Nesta situação, a membrana foi impregnada através do vácuo com quantidades distintas do antígeno (IBMP-8.4), a saber: 3, 1,5, 0,75, 0,375, 0,187, 0,094, 0,047 e 0,023 μg por poço. O conjugado foi avaliado nas diluições de 500, 1.000, 2.000 e 4.000 vezes. De acordo com a Figura 23, a diluição do anticorpo secundário baseou-se em sua capacidade em identificar todas as diluições do antígeno, mesmo em situações mais extremas de diluição (0,023 $\mu\text{g}/\text{poço}$). Dessa forma, considerando a maior diluição que ofereceu esta condição, a diluição do anticorpo secundário foi estabelecida em 1:2.000.

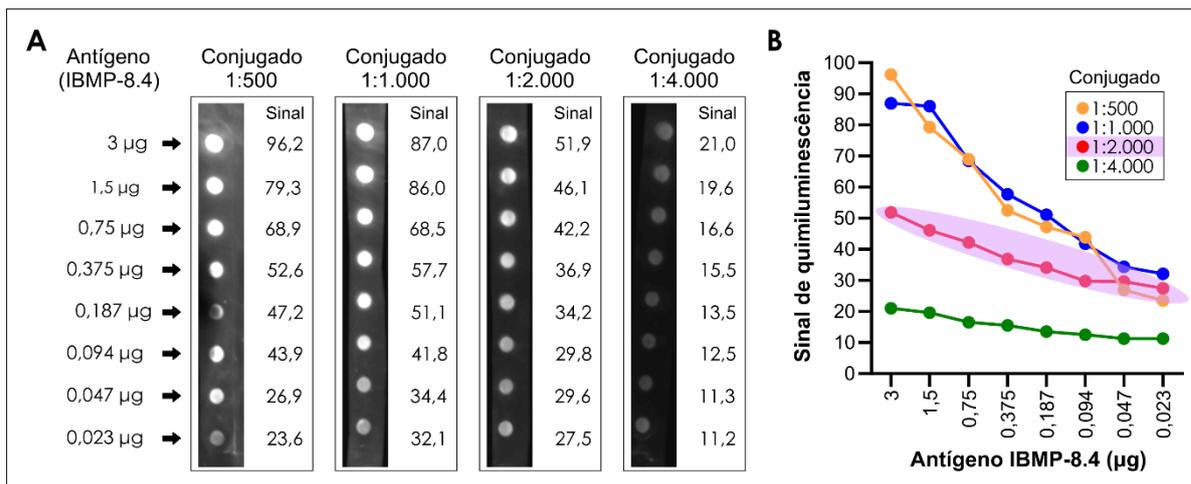


Figura 23: Avaliação da diluição do anticorpo secundário por *Dot-Blot*.

Legenda: Imagens invertidas da membrana de *Dot-Blot* (A); Análise gráfica mostrando a diluição de escolha (círculo lilás).

Nota: A escolha do ponto de diluição baseou-se na capacidade do anticorpo secundário em identificar os antígenos em distintas diluições, com sinal de quimiluminescência superior a 20, mesmo utilizando baixa quantidade de antígeno (0,023 µg/poço)

Fonte: a autora.

Após a definição da diluição das amostras séricas e do anticorpo secundário, foi realizada a técnica de WB para estabelecimento da melhor quantidade do antígeno IBMP-8.4, o qual foi diluído em tampão da amostra e água destilada nas quantidades finais de 50, 25, 12,5, 10 e 2 ng. As amostras foram submetidas à fervura por 5 minutos e, em seguida, depositadas nos poços dos géis. Para esta finalidade foram utilizadas duas amostras positivas (POS-01-P e POS-02-P) e uma negativa (NEG-01-P) para DC (Tabela 2). A condição escolhida foi baseada na determinação do valor da relação sinal-ruído (SNR), sendo selecionado o maior valor. Assim, a quantidade de antígeno para o IBMP-8.4 foi estabelecida em 12,5 ng por poço, no qual apresentou SNR de 101. Esta foi a quantidade de antígeno que proporcionou valor da relação sinal-ruído (SNR) superior a 100. Apesar do SNR ser inferior ao encontrado para 50 ng, optou-se por 12,5 ng devido a presença de bandas inespecíficas nas amostras positivas quando quantidades superiores a 12,5 ng foram avaliadas. As análises gráfica e visual das imagens invertidas podem ser visualizadas na Figura 24.

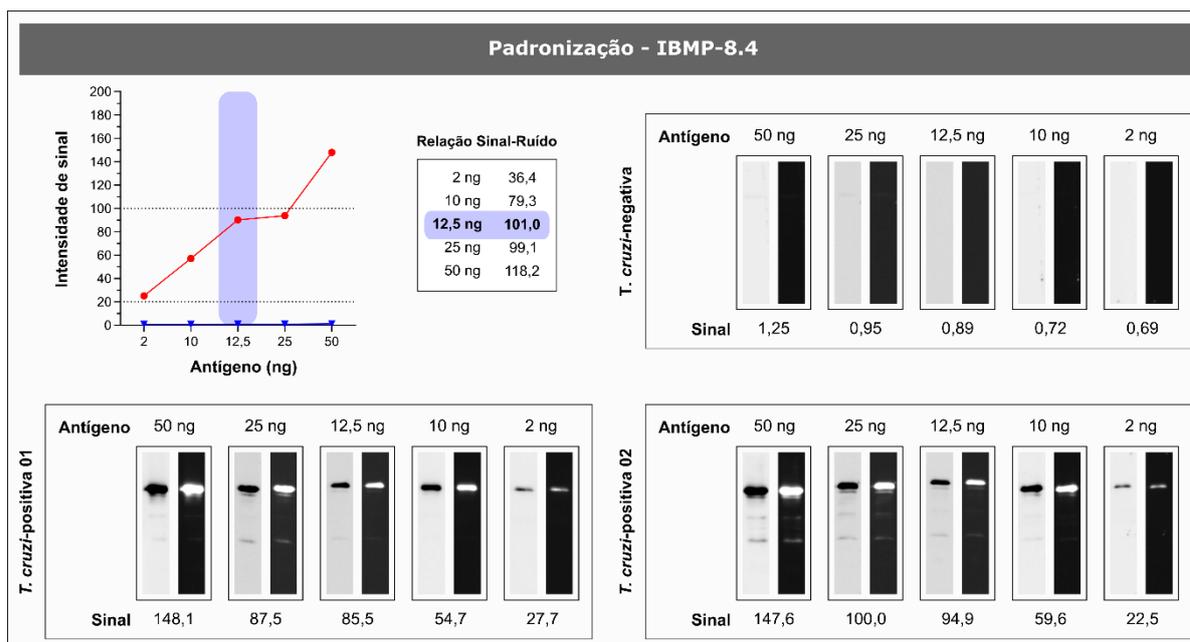


Figura 24: Avaliação da quantidade de antígeno IBMP-8.4 para ser utilizado nos ensaios de *Western blot*.

Legenda: A linha vermelha representa a intensidade média do sinal dos controles positivos, enquanto a azul representa a intensidade de sinal do controle negativo.

Fonte: a autora.

Após o estabelecimento das condições de ensaio para o antígeno IBMP-8.4, foram realizadas as avaliações para os demais antígenos. Para esta finalidade, o anticorpo secundário e as amostras séricas foram utilizados nas mesmas diluições determinadas para o antígeno IBMP-8.4, ou seja, 1:2.000 e 1:100, respectivamente. Foram avaliadas as quantidades de 50, 25, 12,5, 10 e 2 ng do IBMP-8.1, IBMP-8.2 ou IBMP-8.3 por poço. Para as três moléculas, o maior valor de SNR foi atingido ao utilizar 12,5 ng do antígeno por poço: 121,6 para o IBMP-8.1, 46,5 para o IBMP-8.2 e 51,2 para o IBMP-8.3. As análises gráficas e visuais das imagens invertidas podem ser visualizadas nas Figuras 25, 26 e 27, respectivamente.

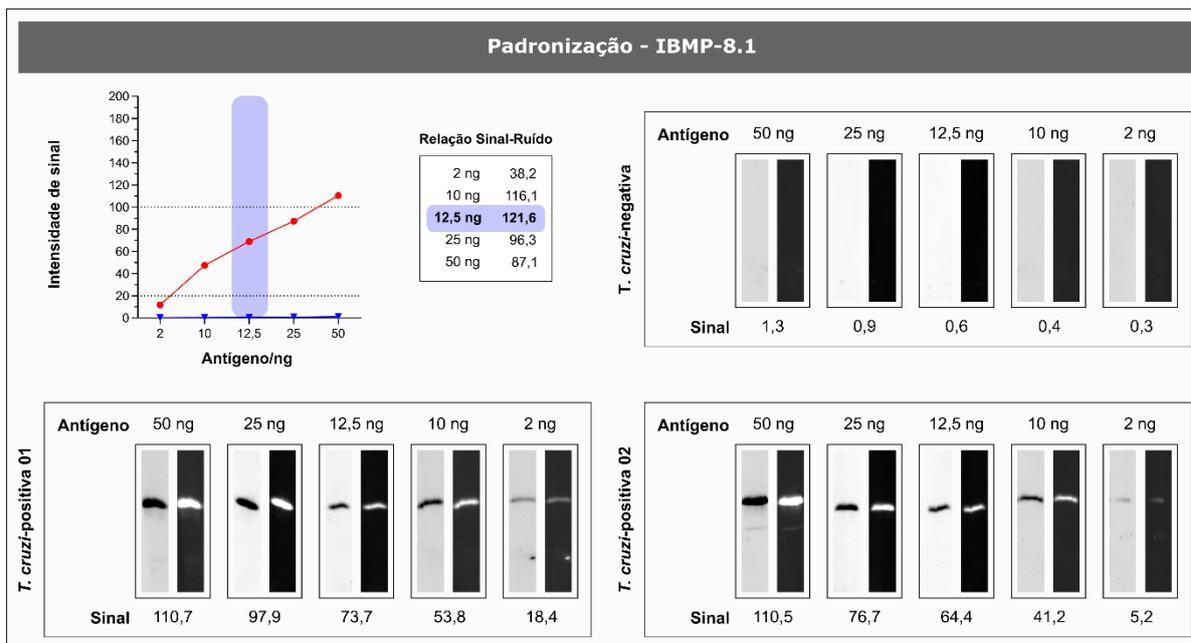


Figura 25: Avaliação da quantidade de antígeno IBMP-8.1 para ser utilizado nos ensaios de *Western blot*.

Legenda: A linha vermelha representa a intensidade média do sinal dos controles positivos, enquanto a azul representa a intensidade de sinal do controle negativo.

Fonte: a autora.

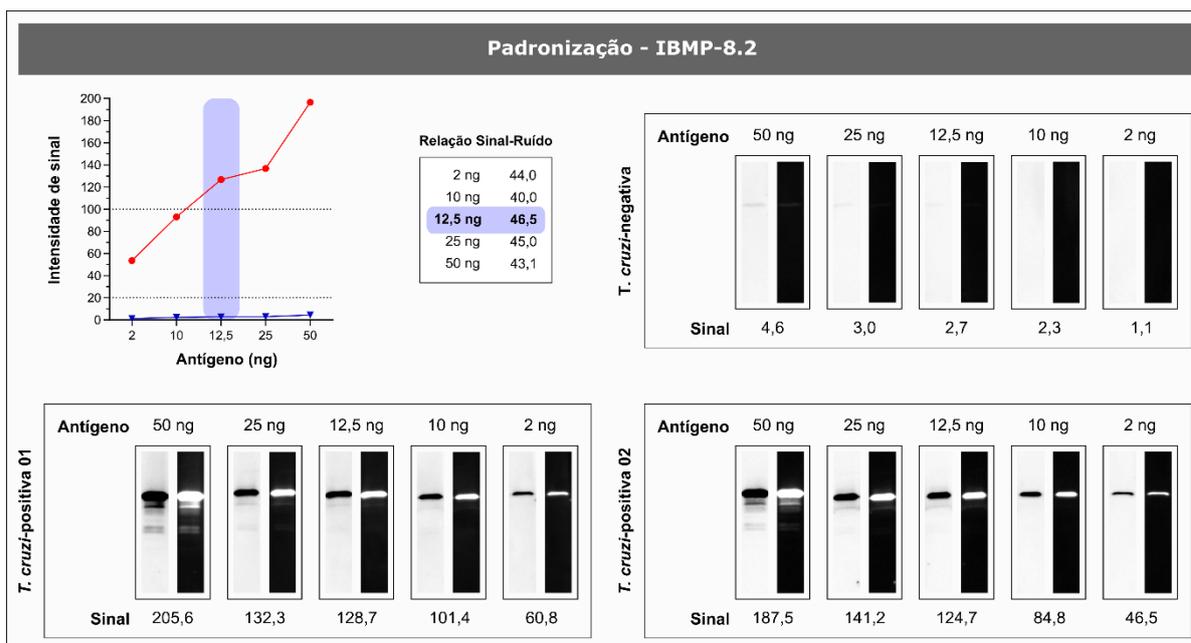


Figura 26: Avaliação da quantidade de antígeno IBMP-8.2 para ser utilizado nos ensaios de *Western blot*.

Legenda: A linha vermelha representa a intensidade média do sinal dos controles positivos, enquanto a azul representa a intensidade de sinal do controle negativo.

Fonte: a autora.

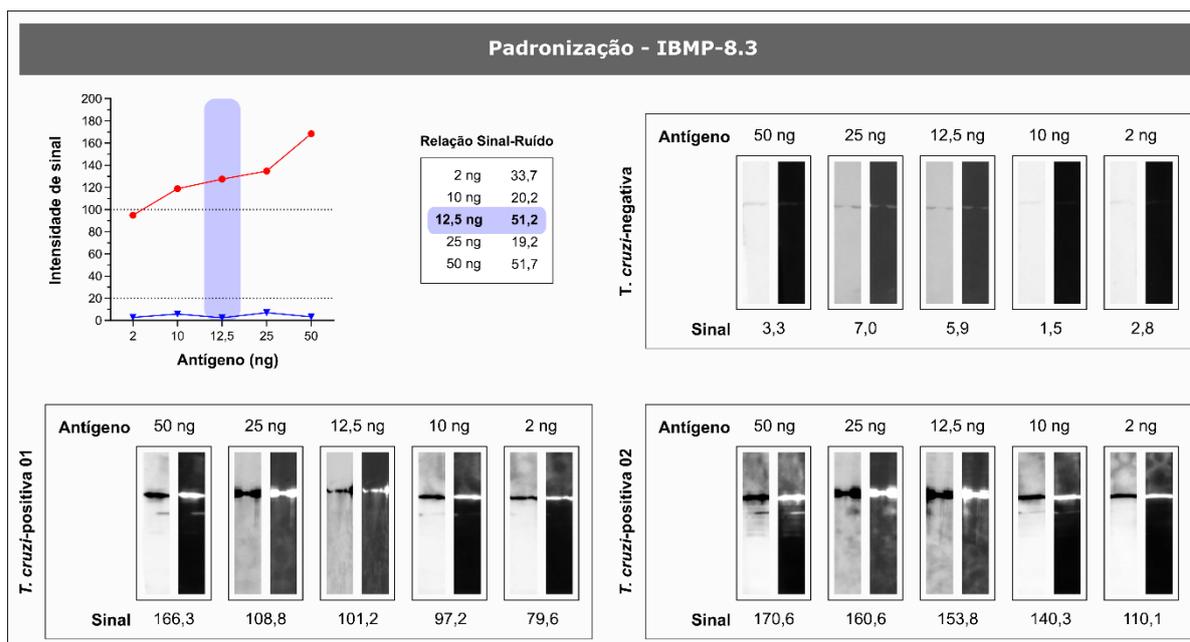


Figura 27: Avaliação da quantidade de antígeno IBMP-8.3 para ser utilizado nos ensaios de *Western blot*.

Legenda: A linha vermelha representa a intensidade média do sinal dos controles positivos, enquanto a azul representa a intensidade de sinal do controle negativo.

Fonte: a autora.

5.3 ESTUDO DE FASE I

A análise da área abaixo da curva ROC (AUC) revelou que todos os antígenos alcançaram a máxima eficiência (AUC = 100%) em diferenciar amostras positivas de negativas para a DC crônica. Segundo a classificação proposta por Swets (1988), todas as quatro moléculas atingiram valores discriminatórios excelentes (Figura 28). Tais resultados são corroborados com a análise das intensidades relativas de bandas (RBI) entre amostras positivas e negativas, a qual demonstrou diferença significativa para os quatro antígenos ($p < 0,0001$).

Do total de amostras positivas ($n = 22$), o antígeno IBMP-8.3 classificou duas delas (9,1%) como falso-negativas, conferindo sensibilidade de 90,9%. Para as demais moléculas, todas as amostras positivas foram corretamente classificadas, resultando em 100% de sensibilidade. Na análise das amostras negativas ($n = 24$), todas foram corretamente classificadas pelas quatro moléculas, obtendo 100% de especificidade. Todas as moléculas apresentaram 100% de acurácia, exceto a IBMP-8.3, que demonstrou ser 95,7% acurada devido às duas amostras positivas classificadas erroneamente como negativas. Dada a sobreposição dos IC95%, não houve diferença significativa nos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia entre os quatro antígenos. O índice de *Kappa* de Cohen revelou

concordância perfeita ($\kappa = 1,00$) para o IBMP-8.1, IBMP-8.2 e IBMP-8.4 e quase perfeita ($\kappa = 0,91$) para o IBMP-8.3. Os parâmetros de desempenho e seus respectivos intervalos de confiança a 95% estão disponíveis na Figura 28.

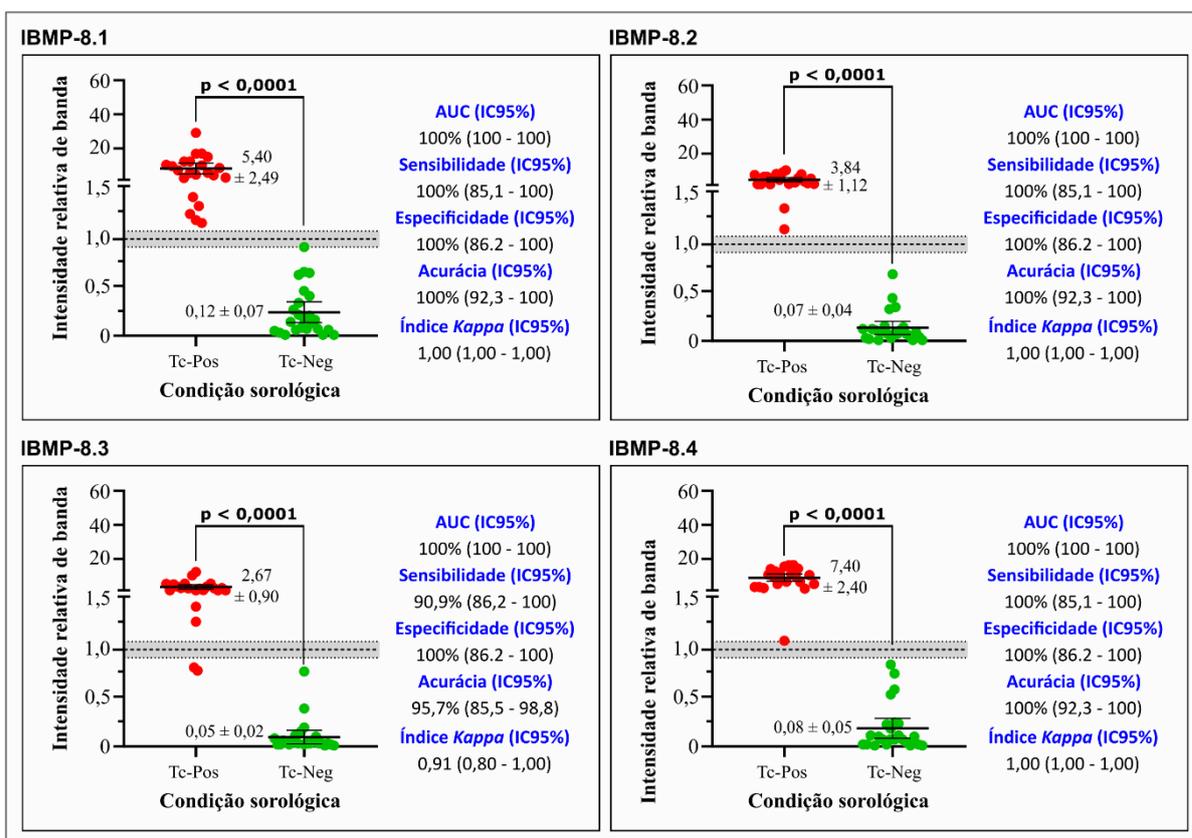


Figura 28: Representação gráfica das intensidades relativas de bandas dos antígenos IBMP no estudo de fase I e parâmetros de desempenho diagnóstico utilizando o *Western blot* como plataforma diagnóstica.

Nota: A área sombreada representa a zona cinza ($IR \pm 10\%$). As linhas horizontais e os números para cada grupo de resultados representam as médias geométricas ($\pm 95\%$ IC) das intensidades relativas de bandas.

Legenda: Tc-Pos: Amostras positivas para *Trypanosoma cruzi*; Tc-Neg: Amostras negativas para *T. cruzi*; AUC: Área abaixo da curva ROC; IC: Intervalo de confiança.

Fonte: a autora.

Dentre as amostras positivas, o antígeno que apresentou a maior média geométrica foi o IBMP-8.4 ($RBI = 7,40 \pm 2,40$), seguido pelo IBMP-8.1 ($RBI = 5,40 \pm 2,49$), IBMP-8.2 ($RBI = 3,84 \pm 1,12$) e IBMP-8.3 ($IR = 2,67 \pm 0,90$) (Figura 28). Para as amostras negativas, o IBMP-8.3 ($IR = 0,05 \pm 0,02$) apresentou o menor sinal de reatividade, seguido pelo IBMP-8.2 ($IR = 0,07 \pm 0,04$), IBMP-8.4 ($IR = 0,08 \pm 0,05$) e IBMP-8.1 ($IR = 0,12 \pm 0,07$). Dada a ausência de sobreposição dos valores de IC95% da RBI das amostras positivas, observou-se que a molécula IBMP-8.3 apresentou valor significativamente inferior ao descrito para a IBMP-8.4.

No grupo das amostras negativas, a análise dos valores de IC95% revelou que não há diferença entre os valores de especificidade. Não foram observados resultados na zona de indeterminação ($0,90 \geq \text{RBI} \leq 1,10$) para nenhuma das quatro moléculas analisadas.

As imagens das membranas de nitrocelulose após reação com amostras positivas e negativas para a DC utilizando as moléculas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 estão disponíveis nas Figuras 29 e 30, respectivamente.

Amostras positivas - *Trypanosoma cruzi*

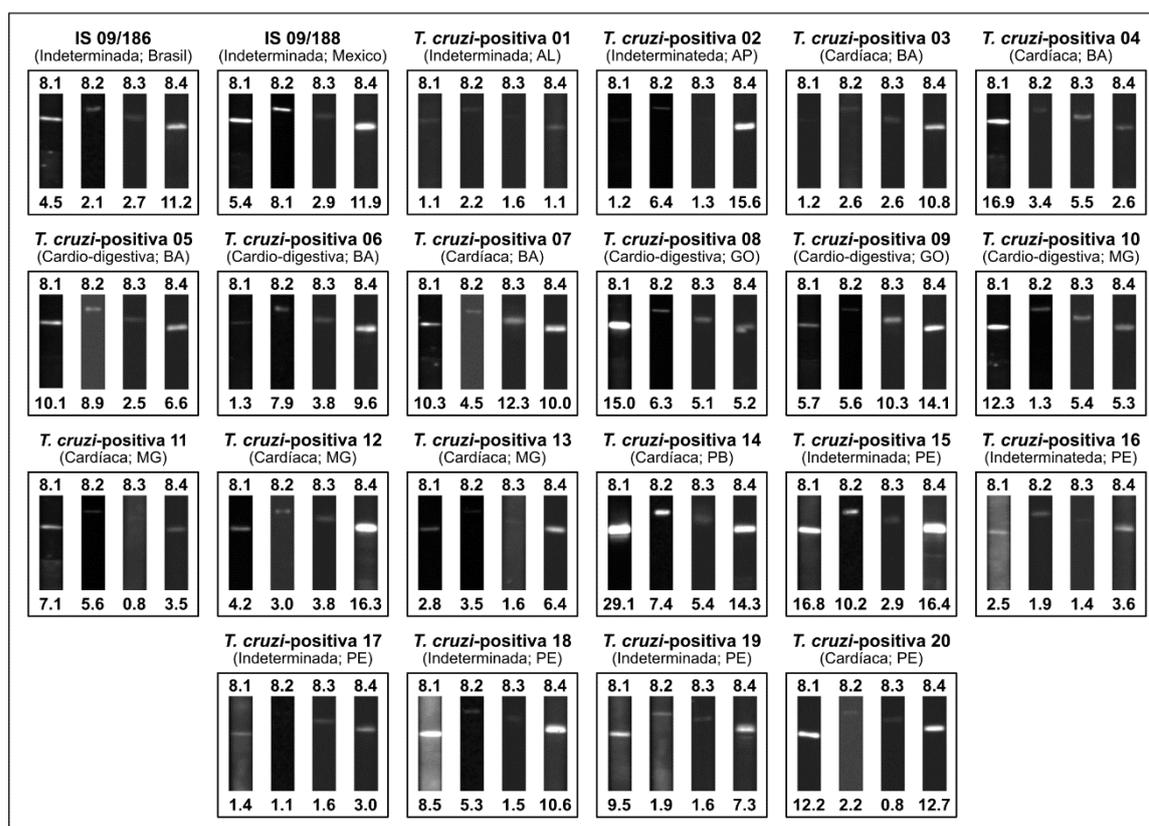


Figura 29: Imagens das membranas de nitrocelulose após reação com amostras positivas para a doença de Chagas utilizando as moléculas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4.

Nota: *Cut-off* = 1,00. Valores numéricos abaixo de cada membrana indicam o a intensidade relativa de banda.

Legenda: BA: Bahia; GO: Goiás; MG: Minas Gerais; PE: Pernambuco.

Fonte: a autora.

Amostras negativas - *Trypanosoma cruzi*

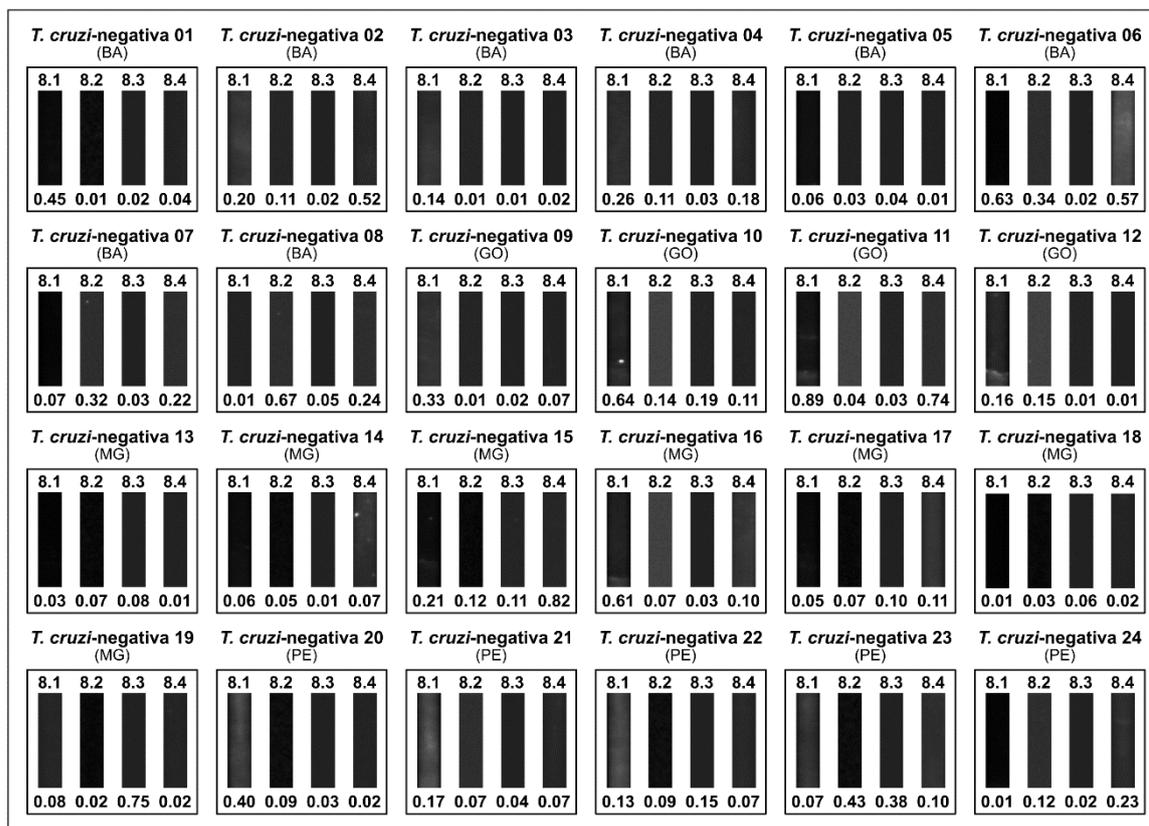


Figura 30: Imagens das membranas de nitrocelulose após reação com amostras negativas para a doença de Chagas utilizando as moléculas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4.

Nota: $Cut-off = 1,00$. Valores numéricos abaixo de cada membrana indicam o a intensidade relativa de banda.

Legenda: BA: Bahia; GO: Goiás; MG: Minas Gerais; PE: Pernambuco.

Fonte: a autora.

5.4 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA

A avaliação gráfica das reações cruzadas está descrita na Figura 31. Para esta avaliação foram utilizadas somente três amostras positivas para leishmaniose visceral, cedidas por colaboradores da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Não houve reatividade para nenhuma das três amostras analisadas pelos quatro antígenos IBMP. Apesar da amostra LV-03 apresentar uma banda clara para a molécula IBMP-8.4 o seu sinal ($RBI = 0,11$) ficou abaixo do ponto de corte ($cut-off = 1,00$). A média dos sinais variou de 0,02 para o IBMP-8.1 até 0,15 para a molécula IBMP-8.2.

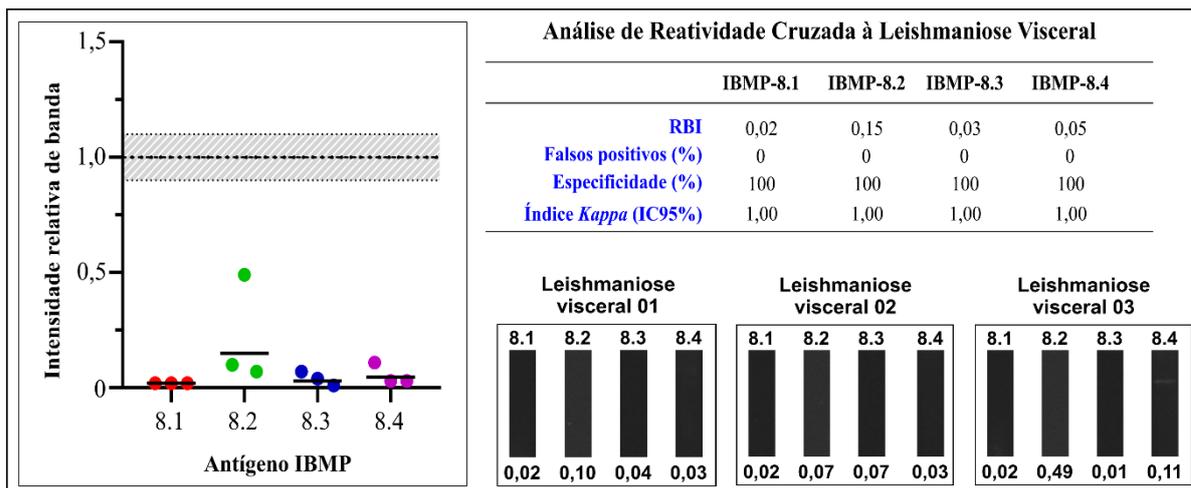


Figura 31: Análise gráfica e visual da reatividade cruzada dos antígenos IBMP para leishmaniose visceral utilizando o *Western blot* como plataforma diagnóstica.

Nota: *Cut-off* = 1,00.

Legenda: RBI: Intensidade relativa de banda; RN: Rio Grande do Norte; LV: Leishmaniose visceral; Neg (negativo).

Fonte: a autora.

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica se baseia em testes sorológicos para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* e isso ocorre por conta da baixa parasitemia relatada nesta fase, o que torna os métodos de diagnóstico parasitológicos diretos pouco confiáveis (BRASIL *et al.*, 2010; OMS, 2002). As técnicas sorológicas utilizadas podem ser convencionais – com o emprego de antígenos parasitários inteiros e/ou extratos purificados – ou não convencionais – quando antígenos recombinantes e/ou peptídeos sintéticos constituem as matrizes antigênicas dos testes. Os ensaios mais comuns são a imunofluorescência, a hemaglutinação, a quimiluminescência e o ELISA indiretos (FLORES-CHÁVEZ *et al.*, 2010).

Uma vez que não há testes de referência (padrão-ouro) disponíveis para a fase crônica, o diagnóstico deve se basear na presença de IgG anti-*T. cruzi* através do uso de dois ensaios sorológicos distintos ou que usem diferentes antígenos na sua matriz (DIAS *et al.*, 2016; OMS, 2002). Embora os fabricantes de testes para a DC relatem sensibilidade e especificidade de aproximadamente 100%, a ocorrência de resultados falso-positivos e inconclusivos é um problema recorrente (sendo 3% em laboratórios clínicos), especialmente quando os títulos sorológicos estão próximos do *cut-off* (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Resultados variados ocorrem possivelmente por conta de alguns fatores, como o uso de diferentes cepas em cada teste, diferentes frações antigênicas, a capacidade imunogênica da cepa em questão, e a variação na resposta imune humoral que cada indivíduo desenvolve durante a infecção (REICHE *et al.*, 1998). Por estes motivos, resultados conflitantes entre os dois testes usados para diagnóstico podem ocorrer, o que leva a um perfil de inconclusividade diagnóstica. Na tentativa de esclarecer a tal inconclusividade, um terceiro ensaio é indicado. O *Western blot* se enquadra nesta situação por apresentar vantagens frente aos demais métodos, pois permite a identificação de anticorpos que reconhecem frações polipeptídicas em misturas antigênicas complexas do parasito. Portanto, o WB pode ter um desempenho melhor do que outras técnicas imunológicas (RIERA *et al.*, 2012). Apesar desta vantagem, o uso de misturas complexas de antígenos apresenta limitações importantes, que podem levar a resultados falso-negativos. De fato, a padronização e reprodutibilidade do teste podem ser prejudicados devido a variabilidade de cultivo do parasito ou alternâncias entre cepas. Outra desvantagem consiste na expressão diferenciada de antígenos a depender da cepa circulante (DE PABLOS; OSUNA, 2012), o que torna os testes indicados para certas regiões geográficas, mas não para outras. Assim, estratégias devem ser formuladas para evitar as desvantagens do uso de misturas complexas do parasito como matriz antigênica do WB de

modo que o teste possa ser utilizado em diferentes regiões geográficas do mundo sem ocorrência de resultados falso-negativos.

Em um estudo realizado em 2016, quatro antígenos recombinantes quiméricos do *T. cruzi* (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4) foram expressos e seus desempenhos avaliados no diagnóstico sorológico da DC (SANTOS *et al.*, 2016b). Naquela ocasião, foi possível identificar anticorpos anti-*T. cruzi* independentemente da cepa do parasito, elevando a sensibilidade dos ensaios sem, contudo, reduzir a especificidade. Trata-se de moléculas linearizadas e formadas por epítomos conservados e repetitivos de diferentes proteínas do *T. cruzi*. Estas moléculas foram posteriormente avaliadas utilizando amostras séricas de indivíduos provenientes de diferentes regiões do mundo e em diferentes plataformas diagnósticas, corroborando com os dados obtidos em 2016 (CORDEIRO *et al.*, 2020; DEL-REI *et al.*, 2019; DOPICO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2017a, 2017b, 2018; SILVA *et al.*, 2020). Devido à sua constituição, estas moléculas identificam uma diversidade maior de anticorpos por apresentarem maior variedade de epítomos disponíveis para ligação, o que possibilita a sua utilização em diferentes cenários de endemicidade e de circulação de cepas distintas do parasito. De fato, a variabilidade antigênica e a expressão diferenciada de antígenos podem comprometer a identificação de alguns epítomos presentes na proteína quimérica, mas dificilmente a farão com todos os epítomos. Assim, diante da alta especificidade e sensibilidade relatadas nos ensaios de WB (GOMES *et al.*, 2001; RIERA *et al.*, 2012), a utilização das proteínas recombinantes quiméricas IBMP aumentaria os parâmetros de desempenho, resultando numa técnica confirmatória confiável.

No ano de 2016 o único teste comercial de WB para DC teve sua fabricação interrompida, deixando uma lacuna no diagnóstico confirmatório para DC crônica no mundo. Diante deste fato, e dadas as características dos antígenos quiméricos, nós avaliamos e validamos o desempenho dos antígenos IBMP na identificação da DC crônica, utilizando o WB como plataforma diagnóstica. Os resultados obtidos serão discutidos a seguir.

6.1 WESTERN BLOT NO DIAGNÓSTICO DA DC

O WB é comumente utilizado para o diagnóstico clínico de diversas doenças parasitárias e fúngicas, como a toxoplasmose, paracoccidioomicose, aspergilose e equinococose. Este método também é empregado no diagnóstico confirmatório das infecções causadas pelo HIV-1/2 e pelo HTLV-1/2 (CAMPOS *et al.*, 2020; DA SILVA BRITO *et al.*, 2018; MISHRA; TIWARI; GOMES, 2017). Diversos pesquisadores investigaram a utilidade do WB no diagnóstico confirmatório da DC quando testes convencionais obtiveram resultados

inconclusivos, e altos valores de sensibilidade e especificidade foram relatados (GOMES *et al.*, 2001; MORGADO *et al.*, 1989; REICHE *et al.*, 1998; RIERA *et al.*, 2012; SÁNCHEZ *et al.*, 2001). Em 1985, um estudo utilizou o WB com preparo de extrato bruto de epimastigotas do *T. cruzi* para avaliar o desempenho de antígenos de epimastigota em diagnosticar a DC, contudo foram reconhecidos por anticorpos anti-*T. cruzi*, anti-*Leishmania braziliensis* e anti-*Leishmania donovani* (ARAUJO, 1986). Um outro estudo avaliou o WB na detecção de anticorpos específicos contra polipeptídios antigênicos do *T. cruzi* como um método alternativo para confirmar o diagnóstico laboratorial da DC, utilizando antígenos de epimastigotas da cepa Y (REICHE *et al.*, 1998). Neste estudo, os autores concluíram que o WB pode ser utilizado como um teste confirmatório para DC.

O TESA (*Trypomastigote Excreted-Secreted Antigen*) é um antígeno composto por transialidases, que estimulam fortemente a resposta humoral dos indivíduos infectados. Usualmente, este antígeno é empregado nas investigações que envolvem diagnóstico da DC através do WB, resultando em elevados valores de sensibilidade e especificidade. A sua utilização como antígeno de captura no WB começou em 1996, com o estudo de Umezawa e colaboradores. Naquela ocasião, os autores utilizaram o TESA coletado do sobrenadante de cultura de células LLC-MK2 infectadas com a forma tripomastigota da cepa Y de *T. cruzi*. Foi verificado que, em indivíduos portadores da forma crônica da DC, os valores de sensibilidade e especificidade foram de 100% e 99,4%, respectivamente. Estes achados foram confirmados posteriormente em dois estudos executados com amostras provenientes de diferentes localidades do Brasil (UMEZAWA *et al.*, 1996; UMEZAWA; SHIKANAI-YASUDA; STOLF, 1996).

Diante dos resultados promissores encontrados pelo grupo da Dr^a. Eufrosina Umezawa, a BioMérieux SA do Brasil se interessou pelo teste e passou a comercializar um teste de WB utilizando o TESA como preparação antigênica, denominado TESAcruzi. A partir deste momento, o TESAcruzi passou a ser utilizado no Brasil e no mundo como teste sorológico confirmatório para a DC crônica, sendo recomendado para esta finalidade pelo II Consenso Nacional em Doença de Chagas (DIAS *et al.*, 2016). Em 2010, o seu desempenho diagnóstico foi avaliado em um estudo utilizando 77 amostras séricas de crianças entre 0 e 5 anos residentes em áreas rurais do Brasil (FRADE *et al.*, 2011). Com este grupo amostral, o TESAcruzi apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 99,16%. Assim, o mesmo passou a ser utilizado com frequência para elucidação diagnóstica nos casos de inconclusividade ou discordância de resultados ao empregar outros métodos. Em 2012, Brito e colaboradores utilizaram o TESAcruzi para diagnosticar 41 indivíduos residentes no Rio

Grande do Norte que apresentaram sorologia inconclusiva pelo ELISA, IFI ou HAI (BRITO *et al.*, 2012). Similarmente, Picka e colaboradores utilizaram o TESAcruzi em 84 amostras – das quais 56 foram positivas - sendo considerado pelos autores o melhor teste para elucidar as sorologias inconclusivas para DC dentre os analisados no estudo (ELISA, HAI, IFI e PCR) (PICKA *et al.*, 2007). No entanto, a sua produção foi descontinuada, deixando esta lacuna no diagnóstico confirmatório da DC. Na tentativa de suprir esta deficiência, recomenda-se a utilização de um terceiro método (ELISA, HAI ou IFI) para obtenção de um consenso diagnóstico. Conforme mencionado anteriormente, embora o TESAcruzi apresentasse elevada sensibilidade e especificidade, os antígenos TESA, por serem uma mistura complexa de antígenos, apresentam limitações em seu uso, o que leva a resultados falso-negativos (FRADE *et al.*, 2011; PICKA *et al.*, 2007). Uma estratégia para contornar este obstáculo baseia-se na utilização de antígenos recombinantes ou recombinantes quiméricos.

De fato, antígenos recombinantes também são empregados como matriz antigênica no WB. Em 1994, a glicoproteína purificada GP160 de tripomastigotas foi testada em soros de indivíduos com diagnóstico positivo e todos reagiram positivamente (NORRIS *et al.*, 1994). Em 1995, Krautz *et. al* utilizaram a proteína recombinantes rTc24 na análise do soro de 72 pacientes tratados para DC, sendo 40 não curados e 32 curados. Esta proteína pode ser encontrada na membrana do parasito em todos os estágios evolutivos, principalmente nos flagelos das formas tripomastigota e epimastigota; suas sequências gênicas têm similaridade com as sequências de várias proteínas que se ligam ao cálcio. Interessantemente, todos os pacientes tratados e não curados mostraram reação à proteína (ENGMAN *et al.*, 1989; KRAUTZ *et al.*, 1995; OUAISSI *et al.*, 1992).

As proteínas recombinantes quiméricas são criadas a partir da união de dois ou mais genes que são originalmente codificados para proteínas separadas ou iguais. A tradução resulta em uma única cadeia polipeptídica com propriedades funcionais derivadas de cada uma das proteínas originais (PATEL, R.N., 2012). Elas são utilizadas com a finalidade de melhorar o desempenho dos imunoenaios, aumentando sua sensibilidade e especificidade. Além do favorecimento dos parâmetros de desempenho, as quimeras permitem processos de produção mais simples, diminuição das quantidades de anticorpos empregados nos imunoenaios e maior número de epítomos disponíveis na mesma superfície (AGUIRRE *et al.*, 2006; FRANK *et al.*, 2003; HOUGHTON *et al.*, 2000). Contudo, não há até o momento, estudos que avaliaram a utilização de proteínas quiméricas como matriz antigênica no WB. Portanto, o presente estudo é pioneiro neste tipo de avaliação. Para este objetivo, foram utilizadas quatro proteínas recombinantes quiméricas do *T. cruzi* (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-

8.4), as quais atingiram elevados parâmetros de desempenho em estudos conduzidos anteriormente em distintas plataformas diagnósticas (CORDEIRO *et al.*, 2020; DALTRO *et al.*, 2019; DEL-REI *et al.*, 2019; DOPICO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2016b, 2017b, 2017a; SILVA *et al.*, 2020). O desempenho diagnóstico obtido através do WB corrobora com os achados anteriores do grupo. De fato, as proteínas IBMP apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade, exceto a IBMP-8.3 que alcançou sensibilidade de ~ 91%. O desempenho diagnóstico dos antígenos IBMP é similar àquele relatado para o TESAcruzi, visto que este último apresentava sensibilidade e especificidade também elevados (FRADE *et al.*, 2011) e, por este motivo, era considerado uma excelente técnica confirmatória. Assim, diferente do TESAcruzi que possuía alto custo de produção, era laborioso e necessitava do cultivo do parasito, a utilização dos antígenos recombinantes quiméricos IBMP constituem uma estratégia promissora no diagnóstico confirmatório da DC crônica, pois são obtidas a partir de ferramentas de engenharia genética e projetados para fornecer as propriedades físico-químicas necessárias para melhorar os processos industriais e, assim, diminuir o custo de fabricação final, sem mencionar o seu elevado potencial diagnóstico. Ademais, a utilização de proteínas quiméricas permite a diminuição da quantidade de antígeno empregada nos ensaios. (PUNT *et al.*, 2011). Com base nos resultados obtidos ficou evidente que as quatro moléculas são capazes de diferenciar amostras soronegativas das soropositivas de maneira eficiente e segura. Por conta disto, as quatro são elegíveis para a avaliação de fase II, que será realizada como continuação ao presente estudo.

6.2 PADRONIZAÇÃO DO WB-IBMP

As condições de ensaio, considerando a quantidade de antígeno usado e a diluição do conjugado e das amostras séricas, variam bastante entre os estudos disponíveis na literatura científica. De fato, a quantidade de antígeno usada na sensibilização varia de 0,2 µg a 500 µg (ESCALANTE *et al.*, 2014; GUZMÁN-GÓMEZ *et al.*, 2015; MONTEÓN-PADILLA *et al.*, 1999; TORRES-GUTIÉRREZ *et al.*, 2015), podendo ser preparado a partir de extratos do parasito ou uso de antígenos recombinantes. Para o WB utilizando as proteínas IBMP, foi utilizada uma quantidade menor de antígeno: 12,5 ng para todas as quatro proteínas. A bula do TESAcruzi não traz informações acerca da quantidade de antígeno TESA empregada em cada tira do teste. Concomitantemente, foram também observadas variações nas diluições do anticorpo conjugado, sendo descritas diluições de 1:200 a 1:4.000 (ESPINOZA; MARTÍNEZ; SCHABIB-HANY, 2019; KESPER N. *et al.*, 2000; UMEZAWA *et al.*, 2003). O anticorpo conjugado utilizado no TESAcruzi era um anti-IgG humano conjugado à peroxidase usado na

quantidade de 1 ml por teste, sem descritivo de sua diluição. No WB-IBMP, o conjugado foi padronizado na diluição de 2.000 vezes, sendo necessários apenas 400µL por reação. As diluições do soro do WB-IBMP e do TESAcruzi não diferem entre si, sendo 1:100 em ambos os ensaios; enquanto outros estudos apontam diluições que variam entre 1:50 e 1:2000 (ESCALANTE *et al.*, 2014; KESPER N. *et al.*, 2000; MOURE *et al.*, 2018; SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

6.3 REATIVIDADE CRUZADA

Uma das principais vantagens do ensaio de WB é o baixo quantitativo de reações cruzadas relatado por permitir a identificação de anticorpos contra diferentes frações polipeptídicas de antígenos do parasito, apresentando um padrão de banda específico (CERVANTES-LANDÍN *et al.*, 2014; RIERA *et al.*, 2012). Apesar da RC com espécies do gênero *Leishmania* ser um dos maiores inconvenientes das técnicas sorológicas convencionais para o diagnóstico da DC (ARAUJO, 1986; DALTRO *et al.*, 2019; MALCHIODI *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 2016a), este problema ocorre com menor frequência quando o WB é utilizado. Pesquisadores utilizaram o WB para descartar a infecção cruzada de 5 pacientes espanhóis com leishmaniose (ABRAS *et al.*, 2016). Em 2009, Campos e colaboradores analisaram pelo WB o percentual de indivíduos com leishmaniose confirmada que apresentavam sorologia positiva para a DC, tendo como resultado apenas 10% de RC de um total de 145 amostras (CAMPOS *et al.*, 2009).

Em 2019, a reatividade cruzada dos antígenos IBMP foi avaliada por ELISA utilizando amostras séricas de indivíduos positivos para leishmaniose cutânea (n = 600) e visceral (n = 229). Para a leishmaniose cutânea, as IBMP-8.1 e IBMP-8.2 foram reativas para somente 0,70% das amostras, enquanto a IBMP-8.3 foi reativa para 0,35% das amostras testadas. Para leishmaniose visceral, foi reportado 3,49% e 0,58% de reatividade cruzada quando as amostras foram avaliadas pelo IBMP-8.2 e IBMP-8.3, respectivamente. Já a molécula IBMP-8.4 não exibiu reações para absolutamente nenhuma das 829 amostras testadas. Resultados semelhantes foram observados para a molécula IBMP-8.1 quando amostras positivas para leishmaniose visceral foram avaliadas (DALTRO *et al.*, 2019). Diante destes achados, três amostras positivas para leishmaniose visceral foram avaliadas através dos ensaios WB-IBMP, resultando na ausência de reatividade. Apesar do baixo quantitativo amostral utilizado, a ausência de positividade para leishmaniose e baixo índice de reatividade nas avaliações utilizando o ELISA sugerem que os antígenos IBMP possuem potencial para serem utilizados em áreas de co-endemicidade entre a DC e a leishmaniose. No estudo de fase II, o quantitativo amostral será ampliado para confirmar esta possibilidade. No TESAcruzi, reações cruzadas

raramente eram relatadas, por conta da alta especificidade do teste (FRADE *et al.*, 2011); porém em 2005, Amato *et al.* encontraram 6,6% de positividade utilizando amostras proveniente de indivíduos portadores de leishmaniose visceral (AMATO NETO *et al.*, 2005).

7 CONCLUSÕES

Diante da descontinuação do TESA-cruzi, o diagnóstico confirmatório da DC perdeu um teste relevante para a conclusão de resultados inconclusivos e discordantes, surgindo a necessidade de utilização de outros testes para a confirmação da doença, que nem sempre conseguem definir o estado sorológico dos pacientes. Desta forma, avaliamos o uso dos antígenos recombinantes quiméricos IBMP como matrizes antigênicas no WB, para avaliar seu comportamento e possibilidade de uso como teste confirmatório para a DC crônica. Como resultados, a padronização do WB-IBMP revelou máxima capacidade discriminatória entre amostras negativas e positivas para a doença de Chagas crônica quando utilizado 12,5 ng de antígeno, aliada a diluição de 1:2.000 para o anticorpo conjugado e 1:100 para as amostras séricas; sendo a quantidade de antígeno usada nos ensaios 16 vezes menor daquela descrita em outros estudos. Os valores de AUC encontrados indicam que os IBMP apresentam elevada capacidade discriminatória na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*, sendo capazes de diferenciar de maneira eficiente e segura amostras positivas de negativas. Os antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2 e IBMP-8.4 apresentaram sensibilidade e especificidade de 100%. O IBMP-8.3 foi o único antígeno que não apresentou sensibilidade de 100%. Contudo, similarmente aos demais, sua especificidade foi de 100%. Apesar do pequeno número amostral analisado, os antígenos IBMP não apresentam reação cruzada com leishmaniose visceral, sugerindo a sua utilização em regiões geográficas de co-endemicidade da DC com leishmaniose.

A utilização de antígenos recombinantes quiméricos neste tipo de ensaio é vantajosa, já que há diminuição nos custos de produção e comercialização, por conta das características apresentadas pelas proteínas quiméricas, tais como: obtenção pelo processo de batelada industrial, o que possibilita a produção de gramas de proteínas; a não necessidade de cultivo do parasito, o que diminui os riscos de acidentes laboratoriais que acarretem em contaminação; e a menor quantidade de antígeno necessária nos ensaios. Portanto, diante dos resultados encontrados neste estudo, os quatro antígenos são elegíveis para composição de um estudo de fase II.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar estudo de fase II;
- Avaliar o uso isolado ou combinado dos antígenos na mesma tira reativa;
- Ampliar o quantitativo amostral para avaliar a reatividade cruzada com leishmaniose, bem como para outras doenças infecto-parasitárias de interesse médico no Brasil;
- Realizar a análise de reprodutibilidade;
- Avaliar o desempenho das moléculas usando o método colorimétrico para análise visual dos resultados.

REFERÊNCIAS

- ABRAS, A. *et al.* Serological diagnosis of chronic Chagas disease: is it time for a change? **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 54, n. 6, p. 1566–1572, Apr. 2016.
- AGUIRRE, S. *et al.* Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3768–3774, Oct. 2006.
- ALMEIDA, E. *et al.* Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas disease and blood bank screening. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 513-517, dez. 1990.
- AMATO NETO, V. *et al.* Observações sobre o TESA blot no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 6, p. 534–535, dez. 2005.
- ANDRADE, J. P. DE *et al.* I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, p. 434–442, jun. 2011.
- ANGHEBEN, A. *et al.* Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. **Euro Surveillance**, Saint-Maurice, v. 16, n. 37, sept. 2011.
- ANTINORI, S. *et al.* High frequency of adverse reactions and discontinuation with benznidazole treatment for chronic Chagas disease in Milan, Italy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 60, n. 12, p. 1873–1875, Mar. 2015.
- ANTINORI, S. *et al.* Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **European Journal of Internal Medicine**, Basingstoke, v. 43, p. 6-15, Sep. 2017.
- ARAÚJO, A. *et al.* Paleoparasitology of Chagas disease - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl. 1, p. 9–16, jul. 2009.
- ARAÚJO, F. G. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. **Infection and Immunity**, Washington, v. 53, n. 1, p. 179–185, Jul. 1986.
- AUFDERHEIDE, A. C. *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 7, p. 2034–2039, Feb. 2004.
- BACIGALUPO, A. *et al.* Sylvatic foci of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Chile: description of a new focus and challenges for control programs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 5, p. 633–641, ago. 2010.
- BANOO, S. *et al.* Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 9, p. 21-31, Sept. 2006.
- BASILE, L. *et al.* Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **Euro Surveillance**, Saint-Maurice, v. 16, n. 37, p. 3, sept. 2011.
- BENCHIMOL BARBOSA, P. R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 112, n. 1, p. 132–133, Sep. 2006.

- BERN, C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 4, p. 655–681, Oct. 2011.
- BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. **Advances in Parasitology**, London, v. 75, p. 19-47, 2011.
- BRASIL, P. E. *et al.* ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 10, n. 337, Nov 2010.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 27, n. 1, p. 347–382, Oct. 1973.
- BRENER, Z; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives Allergy Immunology**, Basel, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.
- BRENIÈRE, S. F. *et al.* Wild populations of *Triatoma infestans*: compilation of positive sites and comparison of their ecological niche with domestic population niche. **Acta Tropica**, Basel, v. 176, p. 228–235, Dec 2017.
- BRITO, C. R. DO N. *et al.* Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection in the semiarid rural zone of the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 3, p. 346–352, jun 2012.
- BUITRAGO, R. *et al.* First report of widespread wild populations of *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the valleys of La Paz, Bolivia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 82, n. 4, p. 574–579, Apr 2010.
- CABALLERO, Z. C. *et al.* Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, n. 8, p. 1045–1049, Aug 2007.
- CAMPOS, K. R. *et al.* Line immunoassay for confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections in inconclusive Western blot serum samples from Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 58, n. 1, p. 1–12, Dec. 2020.
- CAMPOS, Y. *et al.* Serological diagnosis of Chagas disease: evaluation and characterisation of a low cost antigen with high sensitivity and specificity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v. 104, n. 6, p. 914–917, set. 2009.
- CAMUSSONE, C. *et al.* Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 16, n. 6, p. 899–905, Jun 2009.
- CARLIER, Y. *et al.* Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**, Basel, v. 121, n. 2, p. 55–70, Feb 2012.
- CARLIER, Y.; TORRICO, F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 36, n. 6, p. 767-771, Dec. 2003.
- CARLIER, Y.; TRUYENS, C. **American Trypanosomiasis Chagas disease: maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi***. Elsevier p. 517–559, 2010.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, London, v. 6, n. 3, p. 342–345, Jun 2009.

- CEBALLOS, L. A. *et al.* First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco. **Journal of Medical Entomology**, United States, v. 46, n. 5, p. 1195–1202, Sep 2009.
- CERVANTES-LANDÍN, A. Y. *et al.* High molecular weight proteins of *Trypanosoma cruzi* reduce cross-reaction with *Leishmania* spp. in serological diagnosis tests. **BioMed Research International**, New York, Jul. 2014.
- CHAGAS, C. J. R. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, 159-218, ago. 1909.
- CORDEIRO, T. A. R. *et al.* Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of Chagas and visceral *Leishmaniasis* for point of care diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, Barking, v. 169, Dec. 2020.
- CORRÊA, R. R.; SPINOLA, H. N.. Description of *Triatoma pseudomaculata*, a new species of Triatominae of Sobral, Ceará (Hemiptera, Reduviidae). **Arquivos de Higiene e Saúde Pública**, São Paulo, v. 29, n. 101, p. 115-127, set. 1964.
- COSTA, J. *et al.* Distributional potential of the *Triatoma brasiliensis* species complex at present and under scenarios of future climate conditions. **Parasites and Vectors**, London, v. 7, May 2014.
- COURA, J R; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, London, v. 465, Jun. 2010.
- COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - a comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 277–282, maio 2015.
- COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 7, p. 856–862, nov. 2014.
- COUTINHO, M.; DIAS, J. C. P. **A descoberta da doença de Chagas**. 1999. Disponível em: <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/cct/article/view/8895>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- DA SILVA BRITO, V. *et al.* Performance of commercially available serological screening tests for human T-cell lymphotropic virus infection in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washigton, v. 56, n. 12, p. 8–14, Nov. 2018.
- DA SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 286–291, Jun. 2001.
- DALTRO, R. T. *et al.* Cross-reactivity using chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens: diagnostic performance in settings where Chagas disease and American cutaneous or visceral Leishmaniasis are coendemic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washigton, v. 57, n. 8, p. 1–10, Jul. 2019.
- DARIO, M.A. *et al.* Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo State, Brazil).

Parasitology Vectors, London, v. 9, n. 1, Aug. 2016.

DE PABLOS, L. M.; OSUNA, A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 80, n. 7, p. 2258–2264, Jul. 2012.

DEL-REI, R. P. *et al.* Detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies by chimeric antigens in chronic Chagas disease - individuals from endemic South American countries. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 4, p. 1–12, Apr. 2019.

DIAS, J. C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 147–156, jul. 1989.

DIAS, J. C. *et al.* 2nd Brazilian consensus on Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 49, p. 3–60, dez. 2016.

DIAS, J.C. *et al.* Pesquisas prioritárias sobre doença de Chagas na Amazônia: agenda de curto-médio prazo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 5, p. 497–498, set-out. 2001.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 603–612, jul. 2002.

DO BRASIL, P. E. A. A.; CASTRO, R.; DE CASTRO, L. Commercial enzyme-linked immunosorbent assay versus polymerase chain reaction for the diagnosis of chronic Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 1, p. 1–19, jan. 2016.

DOPICO, E. *et al.* Immune reactivity to *Trypanosoma cruzi* chimeric proteins for Chagas disease diagnosis in immigrants living in a non-endemic setting. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 19, n. 1, p. 1–7, Mar. 2019.

ENGMAN, D. M. *et al.* A novel flagellar Ca²⁺-binding protein in trypanosomes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 31, p. 18627–18631, Nov. 1989.

ESCALANTE, H. *et al.* Western blot technique standardization for specific diagnosis of Chagas disease using excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, Lima, v. 31, n. 4, p. 644–651, dic. 2014.

ESPINOZA, B.; MARTÍNEZ, I.; SCHABIB-HANY, M. First report of family clusters of Chagas disease seropositive blood donors in Mexico City and their epidemiological relevance. **Acta Tropica**, Basel, v. 193, p. 23–30, May 2019.

FLORES-CHÁVEZ, M. *et al.* Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 28, n. 5, p. 284–293, mayo 2010.

FRADE, A. F. *et al.* Western blotting method (TESAcruzi) as a supplemental test for confirming the presence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in finger prick blood samples from children aged 0-5 years in Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 117, n. 1, p. 10–13, jan. 2011.

- FRANK, F. *et al.* Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. **Parasitology**, London, v. 126, n. 1, p. 31-39, Jan. 2003.
- GADELHA, A. Á. M. *et al.* Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test. **Vox Sanguinis**, Basel, v. 85, n. 3, p. 165–170, Oct. 2003.
- GARCIA, E. S. *et al.* Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 10, p. 499–505, Oct. 2010.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, Basel, v. 115, n. 1–2, p. 22–27, Jul 2010.
- GÓES, C., 2019. **Chega a 40 número de pessoas em tratamento por causa de surto de doença de Chagas**. Disponível em: <https://g1.globo.com/pe/paranaguá/noticia/2019/06/28/chega-a-40-numero-de-pessoas-em-tratamento-por-cao-de-surto-de-doenca-de-chagas.ghtml/>. Acesso em: ago 2021.
- GOMES, Y. M. *et al.* Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant- Chagas-Biomanguinhos kit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 1–20, maio 2001.
- GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl. 1, p. 115–121, jul. 2009.
- GURGEL-GONÇALVES, R. *et al.* Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **Journal of Tropical Medicine**, Cairo, Feb. 2012.
- GUZMÁN-GÓMEZ, D. *et al.* Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. **Parasites and Vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 1–8, Sep. 2015.
- HNASKO, R. ELISA: methods and protocols. **Springer New York**, v. 1318, p. 1-216, 2015.
- HOUGHTON, R. L. *et al.* Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. **Journal of Infectious Diseases**, London, v. 181, n. 1, p. 325–330, Jan. 2000.
- HUBÁLEK, Z. Epidemiology of Lyme borreliosis in the UK. **Current Problems in Dermatology**, Basel, v. 37, p. 31–50, 2009.
- JACKSON, Y. *et al.* Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 2, p. 1–7, Feb. 2010.
- KESPER N., J. *et al.* Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 4, p. 862–867, Aug. 2000.
- KIM, B. **Molecular Profiling**. New York, N: Springer New York, 2017. v. 1606.

KIRCHHOFF, L. V. *et al.* Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by detection of antibody to the 72- and 90-kilodalton glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 155, n. 3, p. 561 - 564, Mar, 1987.

KONGSTED, A; NIELSEN, A.M. Latent Class Analysis in health research. **Journal of Physiotherapy**, Hawthorn, v. 63, n. 1, p. 55-58, Jan 2017.

KRAUTZ, G. M. *et al.* Use of a 24-kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washigton, v. 33, n. 8, p. 2086–2090, Aug. 1995.

KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, ciências, saúde - Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 16 n. 1, p. 13–34, jul. 2009.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 159-174, Mar. 1977.

LEONY, L. M. *et al.* Performance of recombinant chimeric proteins in the serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 6, p. e0007545, Jun. 2019.

LEIBY, D. A. *et al.* Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: Comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. **Journal of Clinical Microbiology**, Washigton, v. 38, n. 2, p. 639–642, Feb 2000.

LONGHI, S. A. *et al.* Evaluation of in-house ELISA using *Trypanosoma cruzi* lysate and recombinant antigens for diagnosis of Chagas disease and discrimination of its clinical forms. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 87, n. 2, p. 267–271, Aug. 2012.

LUQUETTI, A. O.; SCHMUÑIS, G. A. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition**. [s.l: s.n.]. p. 687–730, 2017.

MAHMOOD, T.; YANG, P. C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, Hamilton, v. 4, n. 9, p. 429–434, Sep. 2012.

MALCHIODI, E. L. *et al.* Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp ; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 97, n. 3, p. 417–423, Sep. 1994.

MARCIPAR, I. S. *et al.* Use of full-length recombinant calflagin and its C fragment for improvement of diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washigton, v. 43, n. 11, p. 5498–5503, Nov 2005.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Forma indeterminada da moléstia de Chagas. Proposta de novos critérios de caracterização e perspectivas de tratamento precoce da cardiopatia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 79, n. 6, p. 623-627, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe técnico recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: Secretaria de Vigilância em Saúde.

Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Revista de Patologia Tropical**, [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/>>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos**. 2016. Disponível:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0158_04_02_2016.html. Acesso em: 16 jun 2019.

MISHRA, M.; TIWARI, S.; GOMES, A. V. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. **Expert Proteomics.**, London, v. 14, n. 11, p. 1037–1053, Nov. 2017.

MONCAYO, Á. Carlos Chagas: Biographical sketch. **Acta Tropica**, Basel, v. 115, n. 1–2, p. 1–4, Aug. 2010.

MONTEÓN-PADILLA, V. M. *et al.* American trypanosomiasis (Chagas' disease) and blood banking in Mexico City: seroprevalence and its potential transfusional transmission risk. **Archives of Medical Research**, Mexico, v. 30, n. 5, p. 393–398, oct. 1999.

MOREIRA, A. L. E. F.; GOMES, M. DE F. S. G. Y. DE M. Doença de Chagas – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde público. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, v. II., Série TELELAB, p. 43–45, 1998.

MORGADO, M. G. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: identification of specific epimastigote antigens by human immune sera. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, n.3, set. 1989.

MOURE, Z. *et al.* The challenge of discordant serology in Chagas disease: the role of two confirmatory techniques in inconclusive cases. **Acta Tropica**, Basel, v. 185, p. 144–148, Sep. 2018.

MUÑOZ, J. *et al.* Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1736–1740, Jun. 2009.

NAGAJYOTHI, F. *et al.* Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**, Chicago, v. 14, n. 5, p. 634–643, May 2012.

NÓBREGA, A. A. *et al.* Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 4, p. 653–655, Apr. 2009.

NORRIS, K. A. *et al.* Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human Chagas' disease. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 62, n. 9, p. 4072–4074, Sep. 1994.

OELEMANN W., TEIXEIRA M., PERALTA J. Screening and confirmation in Chagas disease serology - a contribution. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Suppl 1: 307–8, 1999.

OELEMANN W. *et al.* A recombinant peptide antigen line immunoassay optimized for the confirmation of Chagas' disease. **Transfusion**, Arlington, v. 39, n. 7, p. 711–717, Jul 1999.

OUAISSI, A. *et al.* Cloning and sequencing of a 24-kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. **Biology of the Cell**, Ivry sur Seine, v. 75, n. 1, p. 11–17, 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. World Health Organization, 2021. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 11 ago. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE *et al.* **Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee**. World Health Organization, 2002. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42443/WHO_TRS_905.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 25 mar. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis): targets and milestones for overcoming neglected tropical diseases 2011-2020**. Disponível em: <https://www.who.int/chagas/strategy/milestones/en/>. Acesso em: ago. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests**. Geneva, p. 1-25, Jul 2007. Disponível em: https://www.who.int/bloodproducts/ref_materials/WHO_Report_1st_Chagas_BRP_consultation_7-2007_final.pdf. Acesso em: 25 mar. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record**, v. 90, p. 33–43, 2015.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. **PAHO consultation on congenital Chagas disease, its epidemiology and management**. Montevideo, Jun. 2004. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/paho-consultation-congenital-chagas-disease-its-epidemiology-and-management-montevideo>. Acesso em: 16 maio 2021.

PATEL, R.N. 9.12 Industrial applications of biocatalytic hydrolysis (esters, amides, epoxides, nitriles) and biocatalytic dynamic kinetic resolution. **Elsevier**, 2012.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, London, v. 391, n. 10115, p. 82–94, Jan. 2018.

PEVERENGO, L. M. *et al.* Development and assessment of an improved recombinant multiepitope antigen-based immunoassay to diagnose chronic Chagas disease. **Parasitology**, London, v. 145, n. 12, p. 1594–1599, Oct. 2018.

PICKA, M. C. M. *et al.* Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for chagas disease. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 2, p. 226–233, abr. 2007.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet**, London, v. 1, n. 2, p. 92–100, Sep. 2001.

PUNT, P. J. *et al.* Fungal protein production: design and production of chimeric proteins. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 65, p. 57–69, 2011.

RASSI, A. *et al.* **Clinical phases and forms of Chagas disease**. Second Edition, [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

RASSI, A. J.; RASSI, A. American Trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, Saunders, v. 26, n. 2, p. 275–291, Jun. 2012.

- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl. 1, p. 152–158, jul. 2010.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, London, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, Apr. 2010.
- RASSI, A.; RASSI, S. G.; RASSI, A. Sudden death in Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 1, p. 86–96, jan. 2001.
- REICHE, E. M. V. *et al.* Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 5, p. 750–756, Nov. 1998.
- RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 3, p. 301–314, jun. 1998.
- RIBEIRO, G. *et al.* Frequent house invasion of *Trypanosoma cruzi*-infected Triatomines in a suburban area of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1–10, Apr. 2015.
- RIBEIRO, G. *et al.* Wide distribution of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. **Parasites & Vectors**, London, v. 12, n. 1, p. 604, Dec. 2019.
- RIERA, C. *et al.* Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 86, n. 3, p. 412–416, Mar. 2012.
- ROCA, C. *et al.* Chagas disease among the Latin American adult population attending in a primary care center in Barcelona, Spain. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 4, Apr. 2011.
- ROCHA, M.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, p. 2–4, Jan. 2003.
- ROLÓN, M. *et al.* First report of colonies of sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Paraguayan Chaco, using a trained dog. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 5, May 2011.
- SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. The architecture of diagnostic research. **British Medical Journal**, London, v. 324, p. 539–541, Mar. 2002.
- SAEZ-ALQUÉZAR, A. *et al.* Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA chagas. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 2, p. 851 - 854, Feb 2000.
- SÁNCHEZ, B. *et al.* Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. **Archives of Medical Research**, Mexico, v. 32, n. 5, p. 382–388, oct. 2001.
- SANTOS, Fred Luciano Neves. **Caracterização do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da doença de Chagas**. 2016. (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

SANTOS, F. L. N. *et al.* Performance assessment of four chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens based on antigen-antibody detection for diagnosis of chronic chagas disease. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. 1–15, Aug. 2016a.

SANTOS, F. L. N. *et al.* Chronic Chagas disease diagnosis: A comparative performance of commercial enzyme immunoassay tests. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 94, n. 5, p. 1034–1039, May 2016b.

SANTOS, F. L. N. *et al.* Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease – a Phase II study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 3, p. 1–20, Mar. 2017a.

SANTOS, F. L. N. *et al.* Performance assessment of a *Trypanosoma cruzi* chimeric antigen in multiplex liquid microarray assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 55, n. 10, p. 2934–2945, Oct. 2017b.

SANTOS, F. L. N. *et al.* Highly accurate chimeric proteins for the serological diagnosis of chronic chagas disease: a latent class analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 99, n. 5, p. 1174–1179, Nov. 2018.

SANTOS, Emily Ferreira dos. **Avaliação de antígenos quiméricos do *Trypanosoma cruzi* para diagnóstico da doença de Chagas em bancos de sangue**. 112 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

SANTOS, E. F. *et al.* Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: a nationwide spatiotemporal analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 14, n. 8, p. 1–16, Aug. 2020b.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries : the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, Suppl. 1, p. 75–85, out. 2007.

SCHOFIELD, C. J. The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge,, v.69, n. 3, p. 363–379, Sep. 1979.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 54, n. 6, p. 845–852, Mar. 2012.

SHIKANAI-YASUDA, *et al.* Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 351–357, set-out 1991.

SILVA, E. D. *et al.* Development of a new lateral flow assay based on IBMP-8.1 and IBMP-8.4 chimeric antigens to diagnose Chagas disease. **BioMed Research International**, New York, Aug. 2020.

SILVA, E.D. Desenvolvimento de ensaio multiplex para diagnóstico da DC utilizando plataformas de testes rápidos. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - **Fundação Oswaldo Cruz**, Curitiba-PR, Brasil, 2016.

SILVEIRA-LACERDA, E. P. *et al.* Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. **Vox Sanguinis**, Basel, v. 87, n. 3, p. 204–207, Oct. 2004.

- SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial (The control of vectorial transmission). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 44, Suppl. 2, p. 52–63, 2011.
- STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. **Global Heart**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 139-144, Sep. 2015.
- STEVENS, L. *et al.* Kissing Bugs. The Vectors of Chagas. **Advances in parasitology**, London, v. 75, p. 169-192, Aug. 2011.
- SWETS, J. A. Measuring the Accuracy of Diagnostic Systems. **Science**, v. 240, n. 4857, p. 1285–1293, jun. 1988.
- TELLES, S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* ubiquitin as an antigen in the differential diagnosis of Chagas disease and *Leishmaniasis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 23–28, Jun. 2003.
- TORRES-GUTIÉRREZ, E. *et al.* Identification of immunodominant components of an isolate of *Trypanosoma cruzi* by immunoblot and its standardization for diagnostic purposes. **Gaceta Medica de Mexico**, Mexico, v. 151, n. 1, p. 6–13, feb. 2015.
- UMEZAWA, E. S. *et al.* Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 9, p. 2143–2147, Sep. 1996.
- UMEZAWA, E. S. *et al.* Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 5, p. 1554–1560, May 1999.
- UMEZAWA, E. S. *et al.* An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. **Transfusion**, Arlington, v. 43, n. 1, p. 91–97, Jan. 2003.
- UMEZAWA, E. S.; FRANCO DA SILVEIRA, J. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 285–288, 1999.
- UMEZAWA, E. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; STOLF, A. M. S. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 10, n. 6, p. 407–413, 1996.
- WALECKX, E. *et al.* New insights on the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) brought by the genetic analysis of Bolivian sylvatic populations. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 1045–1057, Jul. 2011.
- WALECKX, E. *et al.* New discoveries of sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) throughout the Bolivian Chaco. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 86, n. 3, p. 455–458, Mar. 2012.
- WENDEL, S.; GONZAGA, A. L. Chagas' disease and blood transfusion: a new world problem? **Vox Sanguinis**, Basel, v. 64, n. 1, p. 1–12, 1993.
- ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.180, n. 2, p. 480–486, Aug. 1999.

APÊNDICE A

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação e validação do potencial diagnóstico de proteínas recombinantes para detecção de patógenos investigados pela Hemorrede do Brasil e pela triagem pré-natal do SUS

Pesquisador: FRED LUCIANO NEVES SANTOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67809417.0.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.209.976

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo sobre a utilização de proteínas recombinantes ou proteínas recombinantes quiméricas produzidas a partir de regiões altamente antigênicas dos patógenos cujas infecções são monitoradas pelos programas centrais do SUS, como HIV-1/2, HTLV-1/2, HCV, HBV, doença de Chagas, sífilis, rubéola, sarampo, esquistossomose, filariose, leishmaniose, dengue e leptospirose. Os pesquisadores testarão o desempenho diagnóstico de novos métodos de diagnóstico propostos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Produzir, caracterizar e avaliar o potencial diagnóstico de proteínas recombinantes (antígenos e anticorpos) em Imunoensaios para detecção de patógenos cujas infecções são monitoradas pelos programas centrais do SUS.

Objetivo Secundário:

- 1 - Estabelecer sistemas de expressão e purificação de proteínas recombinantes para detecção de patógenos cujas infecções são monitoradas pelos programas centrais do SUS;
- 2 - Caracterizar e avaliar as propriedades estruturais de proteínas recombinantes para detecção de patógenos cujas infecções são monitoradas pelos programas centrais do SUS, quanto à sua

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121

Bairro: Candeal

CEP: 40.296-710

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3176-2327

Fax: (71)3176-2285

E-mail: cep@bahia.fiocruz.br