

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

FRED LUCIANO NEVES SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DE POLIANTÍGENOS  
PARA DETECÇÃO DO *Trypanosoma cruzi* NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE  
CHAGAS

RECIFE

2016

**FRED LUCIANO NEVES SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DE POLIANTÍGENOS  
PARA DETECÇÃO DO *Trypanosoma cruzi* NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE  
CHAGAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em  
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,  
Fundação Oswaldo Cruz, como requisito  
para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências.

Orientadora: Dra. Yara de Miranda Gomes

Co-orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

Recife

2016

**Catálogo na Fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

S23a Santos, Fred Luciano Neves.

Caracterização do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da doença de Chagas/ Fred Luciano Neves Santos. – Recife: [s. n.], 2016.

196 p.: il.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Yara de Miranda Gomes; coorientador: Marco Aurélio Krieger.

1. Doença de Chagas - diagnóstico. 2. Testes Sorológicos. 3. Quimera. 4. Reações Antígeno-Anticorpo. I. Gomes, Yara de Miranda. II. Krieger, Marco Aurélio. III. Título.

616.937

---

**FRED LUCIANO NEVES SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DE POLIANTÍGENOS  
PARA DETECÇÃO DO *Trypanosoma cruzi* NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE  
CHAGAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em  
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,  
Fundação Oswaldo Cruz, como requisito  
para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências.

Data de aprovação: 18 de março de 2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Yara de Miranda Gomes (Orientadora)  
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

Dr. Rafael Dhália (Membro Interno)  
Departamento de Virologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

Dra. Haiana Charifker Schindler (Membro Interno)  
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida (Membro Externo)  
Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

Dr. Abraham César de Brito Rocha (Membro Externo)  
Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Aos meus pais que tanto fizeram e fazem  
para o meu crescimento profissional e pessoal.  
Eu os amo muito!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre esteve ao meu lado e me guiou em todos os momentos de minha vida.

À minha família, mola mestre de minha vida. Agradeço pelas palavras de apoio, amor, carinho e ensinamento.

Aos meus amigos Marcelo Augusto Pezzete Loro, Aline Souza Prado e Diego Menezes por compreenderem muitos dos meus momentos de estresse e ausência.

À minha orientadora Dra. Yara de Miranda Gomes, que foi a responsável por este trabalho acontecer. Acreditou em mim desde o meu primeiro dia no CPqAM, investindo cada vez mais no meu aprimoramento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador, Dr. Marco Aurélio Krieger pela confiança e pelo investimento realizado em minha formação.

Agradecimento especial ao MSc. Edimilson Domingos Silva (LATED, Biomanguinhos, FIOCRUZ-RJ), ao Dr. Wayner Vieira de Souza (NESC, FIOCRUZ-PE), ao Dr. Filipe Dantas-Torres (CPqAM, FIOCRUZ-PE), à Dra. Paola Alejandra Fiorani Celedon (ICC, FIOCRUZ-PR) e ao Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin (ICC, FIOCRUZ-PR) pelo incondicional apoio e envolvimento para o desenvolvimento deste estudo. Foram inúmeras conversas científicas que, um dia, espero retribuir de algum modo.

Ao Dr. Sinval Brandão Pinto, como representante do CPqAM, e aos coordenadores dos Serviços de Referência e suas equipes aqui representadas pela Dra. Maria Edileuza Felinto Britto (SRL, CPqAM, FIOCRUZ-PE), Dr. Abraham César de Brito Rocha Rocha (SRNF, CPqAM, FIOCRUZ-PE) e Dra. Yara de Miranda Gomes (SRDC, CPqAM, FIOCRUZ-PE).

Aos colegas do LIMP, do Departamento de Imunologia e do CPqAM que estiveram ao meu lado nos momentos de fraqueza, me confortando nos momentos difíceis.

À equipe da biblioteca do CPqAM pela incansável vontade em me receber sempre com sorriso no rosto.

Às Instituições externas que cederam os soros para realização deste estudo, em especial à Betânia Pinto (HEMOPE), Dr. Alejandro Ostermayer Luquetti (UFG), ao Dr. Leonardo Foti (ICC, FIOCRUZ-PR) e toda a equipe do LACEN-PE. Meus agradecimentos são extensivos às equipes de cada uma das Instituições citadas.

À equipe pedagógica do Instituto Pasteur de Paris (França) que se dedicou ao meu aprendizado em um curso intensivo sobre avaliação de testes diagnósticos. Meus agradecimentos especiais à Dra. Muriel Vray e à Dra. Marleen Boelaert, sendo extensivos aos colegas parisienses Marion Dollat, Amélie Dureault, Stéphanie Jacob e Paul Loubet que me ajudaram a entender a língua nos momentos de dificuldade.

E também às pedras no caminho que me trouxeram amadurecimento. Após cada tropeço veio um novo recomeço e com ele novas perspectivas.

A vocês e às pedras deixo o meu agradecimento eterno.

“Não há saber mais ou saber menos: há saberes diferentes”.

Paulo Freire



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.

## RESUMO

O diagnóstico da doença de Chagas crônica (DCC) baseia-se em metodologias que usam em sua fase sólida antígenos brutos, semipurificados ou recombinantes, podendo resultar em baixa sensibilidade ou reação cruzada. Uma forma para resolver este problema é o uso de quimeras formadas por epítomos conservados e repetitivos de diferentes estruturas parasitárias em uma única molécula. O nosso objetivo foi caracterizar e avaliar o uso de quimeras em imunoenaios para o diagnóstico da DCC. As quimeras, IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 foram purificadas por meio de cromatografia e sua pureza avaliada por SDS-PAGE. Ensaio de dicroísmo circular (DC) e espalhamento dinâmico da luz (EDL) foram usados para avaliação do raio hidrodinâmico das quimeras, avaliação de sua estabilidade e escolha do sistema tampão que oferecesse o menor estado de agregação molecular. Ensaio sorológico para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* através de ELISA foram realizados utilizando um painel de 857 amostras positivas para a DCC e 689 negativas. Para avaliação de reação cruzada foram usadas 1079 amostras de diversas doenças endêmicas no país. A purificação foi eficiente uma vez que o SDS-PAGE indicou ausência de degradação das quimeras. As análises de DC e EDL mostraram que as quatro quimeras apresentaram menor tendência de agregação em tampão carbonato pH 9,6, sendo, assim, este o sistema para a sensibilização das placas. Os ensaios sorológicos revelaram valores elevados de sensibilidade (Sen) e especificidade (Esp) para a molécula IBMP-8.4 (Sen-99,3%; Esp-100%). O desempenho para as demais moléculas foi satisfatório, ficando os valores de Sen e Esp acima de 94%. As moléculas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 apresentaram respectivamente 0,46%, 0,85%, 0,46% e 0,37% de reação cruzada. Os resultados apontam que as quimeras atingiram os critérios de proficiência do Ministério da Saúde podendo, dessa forma, ser utilizados em ensaios diagnósticos para a DCC.

**Palavras chave:** Doença de Chagas, Testes Sorológicos, Quimera, Reações antígeno-anticorpo

SANTOS, Fred Luciano Neves. **Characterization of the potential diagnostic of polyantigens for detecting *Trypanosoma cruzi* in the chronic phase of Chagas disease.** 2016. Thesis (Doctoral in Biosciences and Biotechnology for Health) – Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2016.

## ABSTRACT

Chronic Chagas disease (CCD) diagnosis is based on serological methods employing crude, semipurified or recombinant antigens, which eventually may result in low sensitivity or cross-reactivity. An alternative method for solving this problem is the use of chimeric molecules composed by conserved and repetitive epitopes of distinct parasite structures. Our objective was to evaluate the use of chimeras in immunoassays for the diagnosis of CCD. The chimeras IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 and IBMP-8.4 were purified by chromatography and their purity assessed by SDS-PAGE. Circular dichroism (CD) and dynamic light scattering (DLS) were used to assess the hydrodynamic radius of the chimeras, to evaluate their stability and to select the buffering system that offers the lowest state of molecular aggregation. Serological tests for detection of anti-*Trypanosoma cruzi* were performed by ELISA using a panel of 857 positive and 689 negative serum samples for CCD. Cross-reactivity was assessed by using 1079 serum samples from patients with unrelated diseases. The purification was efficient since SDS-PAGE indicated the absence of degradation of chimeric proteins. Analyses of CD and DLS showed that the four chimeras had low aggregation tendency in carbonate buffer, pH 9.6. Serological testing showed high values of sensitivity (Sen) and specificity (Spe) for IBMP-8.4 (Sen-99.3%; Spe-100%). The performance of other molecules was satisfactory, being the Sen and Spe values above 94%. Cross-reaction was observed in 0.46%, 0.85%, 0.46% and 0.37% of the samples tested against IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 and IBMP-8.4, respectively. The results indicate that the chimeras reached the Brazilian Ministry of Health proficiency criteria and may thus be used in diagnostic assays for CCD.

**Key words:** Chagas Disease, Serologic Tests, Chimera, Antigen-Antibody Reactions

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figura 1</b>  | Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas.....  | 26 |
| <b>Figura 2</b>  | Representação esquemática de um <i>T. cruzi</i> na forma epimastigota.....   | 29 |
| <b>Figura 3</b>  | Representação esquemática das formas do <i>T. cruzi</i> .....  | 29 |
| <b>Figura 4</b>  | Representação esquemática do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....  | 31 |
| <b>Figura 5</b>  | Distribuição geográfica da doença de Chagas.....   | 35 |
| <b>Figura 6</b>  | Impacto das ações de controle sobre a doença de Chagas no Brasil.....  | 35 |
| <b>Figura 7</b>  | Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos.....     | 37 |
| <b>Figura 8</b>  | Evolução clínica da doença de Chagas.....  | 39 |
| <b>Figura 9</b>  | Esquema do teste de ELISA.....   | 45 |
| <b>Quadro 1</b>  | Antígenos recombinantes que apresentam sequências repetitivas.....   | 48 |
| <b>Quadro 2</b>  | Antígenos recombinantes pertencentes à família das trans-sialidases e TS-símile que apresentam sequências repetitivas..... | 49 |
| <b>Quadro 3</b>  | Outros antígenos recombinantes propostos para uso diagnóstico.....   | 50 |
| <b>Figura 10</b> | Ilustração da sensibilização de microplacas de titulação seguida pela reação antígeno-anticorpo.....                       | 54 |
| <b>Quadro 4</b>  | Composição dos PRP-IBMP.....   | 61 |
| <b>Figura 11</b> | Combinação binária entre os prováveis resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença..... | 72 |
| <b>Quadro 5</b>  | Interpretação dos valores das razões de verossimilhança.....   | 75 |
| <b>Quadro 6</b>  | Interpretação do índice de Kappa de Cohen ( $\kappa$ ).....  | 77 |
| <b>Figura 12</b> | SDS-PAGE dos PRP-IBMP corados pelo azul de Coomassie R250.....   | 81 |
| <b>Figura 13</b> | Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular dos PRP-IBMP em diferentes sistemas-tampão.....                        | 83 |
| <b>Figura 14</b> | Análise gráfica dos valores médios de absorbância do PRP-IBMP-8.1 com diluição sérica de 25, 50, 100 e 200 vezes.....      | 84 |
| <b>Figura 15</b> | Análise gráfica dos valores médios de absorbância do PRP-IBMP-8.1 com diluição sérica de 100 e 200 vezes.....              | 85 |
| <b>Figura 16</b> | Análise gráfica dos valores médios de absorbância do PRP-IBMP-8.2 com diluição sérica de 100 e 200 vezes.....              | 87 |

|                  |   |     |
|------------------|---|-----|
| <b>Figura 17</b> | Análise gráfica dos valores médios de absorbância do PRP-IBMP-8.3 com diluição sérica de 100 e 200 vezes.....   | 89  |
| <b>Figura 18</b> | Análise gráfica dos valores médios de absorbância do PRP-IBMP-8.4 com diluição sérica de 100 e 200 vezes.....   | 91  |
| <b>Figura 19</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando SFB e BSA.....   | 94  |
| <b>Figura 20</b> | Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular obtidos da avaliação de estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas.....                    | 96  |
| <b>Figura 21</b> | Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular obtidos da avaliação de reversibilidade da desnaturação dos PRP-IBMP a temperaturas extremas..... | 97  |
| <b>Figura 22</b> | Perfil de bandas obtido da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas.....  | 98  |
| <b>Figura 23</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas.....                             | 99  |
| <b>Figura 24</b> | Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular obtidos da avaliação de estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente.....                     | 101 |
| <b>Figura 25</b> | Perfil de bandas obtido da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente.....   | 102 |
| <b>Figura 26</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente.....                              | 104 |
| <b>Figura 27</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a um período de longa duração.....                       | 107 |
| <b>Figura 28</b> | Distribuição binominal negativa para estimativa do n amostral para avaliação de reação cruzada utilizando os PRP-IBMP.....                            | 110 |
| <b>Figura 29</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade de quatro kits comerciais para definição do padrão-ouro.....   | 111 |
| <b>Figura 30</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na fase I do estudo.....  | 115 |
| <b>Figura 31</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na fase II do estudo.....   | 117 |
| <b>Figura 32</b> | Análise gráfica da comparação dos índices de reatividade de amostras negativas e positivas para os PRP-IBMP na fase II do estudo.....                 | 118 |

|                  |  |     |
|------------------|--|-----|
| <b>Figura 33</b> | Análise gráfica da comparação dos intervalos de confiança a 95% da sensibilidade e especificidade dos PRP-IBMP na fase II do estudo.....                   | 119 |
| <b>Figura 34</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade estratificados por região geográfica utilizando os PRP-IBMP na fase II do estudo.....                           | 121 |
| <b>Figura 35</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando misturas equimolares.....   | 125 |
| <b>Figura 36</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando amostras séricas de indivíduos portadores de doenças infecto-parasitárias.....          | 127 |
| <b>Figura 37</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação da reprodutibilidade intraplaca.....  | 130 |
| <b>Figura 38</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação da reprodutibilidade entre lotes.....   | 133 |
| <b>Figura 39</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação da reprodutibilidade entre laboratórios.....  | 136 |
| <b>Figura 40</b> | Comparação dos índices de reatividade entre os PRP-IBMP e kits comerciais.....   | 138 |
| <b>Figura 41</b> | Classificação dos PRP-IBMP e kits comerciais para Chagas quanto aos parâmetros de desempenho.....  | 139 |
| <b>Figura 42</b> | Análise gráfica dos índices de reatividade dos testes comerciais com amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias..... | 140 |
| <b>Figura 43</b> | Análise gráfica da avaliação das interseções de conjuntos usando os PRP-IBMP usando amostras com resultados inconclusivos.....                             | 142 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |   |     |
|------------------|---|-----|
| <b>Tabela 1</b>  | Lotes de produção dos PRP-IBMP.....   | 82  |
| <b>Tabela 2</b>  | Análise do espalhamento dinâmico da luz para os PRP-IBMP.....   | 82  |
| <b>Tabela 3</b>  | Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao PRP-IBMP-8.1  | 86  |
| <b>Tabela 4</b>  | Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao PRP-IBMP-8.2  | 88  |
| <b>Tabela 5</b>  | Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao PRP-IBMP-8.3  | 90  |
| <b>Tabela 6</b>  | Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao PRP-IBMP-8.4  | 92  |
| <b>Tabela 7</b>  | Índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando SFB e BSA.....   | 93  |
| <b>Tabela 8</b>  | Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP utilizando SFB e BSA.....   | 95  |
| <b>Tabela 9</b>  | Índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas.....         | 98  |
| <b>Tabela 10</b> | Concordância obtida da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas.....                    | 100 |
| <b>Tabela 11</b> | Parâmetros de desempenho obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas.....       | 100 |
| <b>Tabela 12</b> | Índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente.....          | 103 |
| <b>Tabela 13</b> | Concordância obtida da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente.....                     | 105 |
| <b>Tabela 14</b> | Parâmetros de desempenho obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente.....        | 105 |
| <b>Tabela 15</b> | Índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a um período de longa duração.....   | 106 |
| <b>Tabela 16</b> | Concordância obtida da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a um período de longa duração.....              | 108 |
| <b>Tabela 17</b> | Parâmetros de desempenho obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a um período de longa duração..... | 109 |
| <b>Tabela 18</b> | Parâmetros de desempenho de quatro kits comerciais para definição do padrão-ouro.....                         | 111 |
| <b>Tabela 19</b> | Índices de reatividade de quatro kits comerciais para definição do padrão-ouro.....                           | 112 |

|                  |  |     |
|------------------|--|-----|
| <b>Tabela 20</b> | Painel sorológico das amostras utilizadas para avaliação do potencial diagnóstico dos PRP-IBMP.....                                  | 113 |
| <b>Tabela 21</b> | Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na fase I do estudo.....   | 114 |
| <b>Tabela 22</b> | Índice de reatividade dos PRP-IBMP na fase I do estudo.....  | 114 |
| <b>Tabela 23</b> | Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na fase II do estudo.....  | 116 |
| <b>Tabela 24</b> | Índice de reatividade dos PRP-IBMP na fase II do estudo.....   | 116 |
| <b>Tabela 25</b> | Correlação entre os PRP-IBMP na fase II do estudo.....   | 119 |
| <b>Tabela 26</b> | Parâmetros de desempenho do PRP-IBMP estratificados por origem ou região geográfica na fase II do estudo.....                        | 120 |
| <b>Tabela 27</b> | Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP utilizando misturas equimolares.....   | 123 |
| <b>Tabela 28</b> | Índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando misturas equimolares.   | 124 |
| <b>Tabela 29</b> | Índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias..... | 128 |
| <b>Tabela 30</b> | Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade intraplaca.....  | 129 |
| <b>Tabela 31</b> | Índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade intraplaca.....  | 129 |
| <b>Tabela 32</b> | Concordância qualitativa e correlação de Spearman dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade intraplaca.....                     | 131 |
| <b>Tabela 33</b> | Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre lotes.....   | 131 |
| <b>Tabela 34</b> | Índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre lotes.....   | 132 |
| <b>Tabela 35</b> | Concordância qualitativa e correlação de Spearman dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre lotes.....                    | 134 |
| <b>Tabela 36</b> | Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre laboratórios.....                                      | 134 |
| <b>Tabela 37</b> | Índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre laboratórios.....  | 135 |
| <b>Tabela 38</b> | Análise Concordância qualitativa e correlação de Spearman dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre laboratórios.....     | 137 |

|                  |  |     |
|------------------|--|-----|
| <b>Tabela 39</b> | Comparação dos parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP com kits comerciais.....  | 137 |
| <b>Tabela 40</b> | Comparação dos índices de reatividade dos PRP-IBMP com kits comerciais.....  | 138 |
| <b>Tabela 41</b> | Análise da correlação entre os PRP-IBMP com kits comerciais.....   | 139 |
| <b>Tabela 42</b> | Índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias..... | 141 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|         |  |
|---------|--|
| AEQ     | Análise externa de qualidade   |
| ANVISA  | Agência Nacional de Vigilância Sanitária   |
| AUC     | <i>Area under curve</i> (Área abaixo da curva)                                   |
| BSA     | <i>Bovine serum albumine</i> (Albumina sérica bovina)                            |
| CO      | <i>Cut-off</i> (Ponto de corte)  |
| CPqAM   | Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  |
| CV      | Coefficiente de variação   |
| DC      | Dicroísmo Circular   |
| DNA     | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)                         |
| DO      | Densidade óptica   |
| DP      | Desvio padrão  |
| EDL     | Espalhamento Dinâmico da Luz   |
| ELISA   | <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)                |
| Esp     | Especificidade   |
| ET      | Erro Total   |
| Exa     | Exatidão   |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz  |
| FN      | Falso-negativo   |
| FP      | Falso-positivo   |
| GPI     | Glicosilfosfatidilinositol   |
| HAI     | Hemaglutinação indireta  |
| HBV     | <i>Hepatitis B virus</i> (Vírus da hepatite B)                                   |
| HCV     | <i>Hepatitis C virus</i> (Vírus da hepatite C)                                   |
| HIV     | <i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)           |
| HRP     | <i>Horseradish peroxidase</i> (Peroxidase de rabanete)                           |
| HTLV    | <i>Human T-cell lymphotropic virus</i> (Vírus linfotrópico de células T humanas) |
| IBMP    | Instituto de Biologia Molecular do Paraná  |
| IC      | Intervalo de confiança   |
| IFI     | Imunofluorescência indireta  |
| IgG     | Imunoglobulina G   |
| IgM     | Imunoglobulina M   |

|          |   |
|----------|---|
| INCQS    | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  |
| IR       | Índice de reatividade   |
| kDNA     | <i>Kinetoplast DNA</i> (DNA do cinetoplasto)  |
| LACEN    | Laboratório Central de Saúde Pública  |
| LATED    | Laboratório de Tecnologia Diagnóstica   |
| MES      | <i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i> (Ácido 2-N-morfolinoetanosulfônico)  |
| OMS      | Organização Mundial da Saúde  |
| PBS-T    | <i>Phosphate buffered saline-Tween 20</i> (Tampão fosfato-Tween 20)   |
| PCR      | <i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)   |
| PFN      | Proporção de falso-negativos  |
| PFP      | Proporção de falso-positivos  |
| PM       | Peso molecular  |
| RPMI     | <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (Meio do Instituto Roswell Park Memorial)   |
| PROCAPE  | Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco   |
| PRP      | Poliantígenos recombinantes purificados   |
| PVDF     | <i>Polyvinylidene fluoride</i> (Fluoreto de polivinilidene)   |
| RIPA     | <i>Radioimmunoprecipitation assay</i> (Radioimunoprecipitação)  |
| ROC      | <i>Receiver operating characteristic</i> (Característica de Operação do Receptor)   |
| RV       | Razão de verossimilhança  |
| SFB      | Soro fetal bovino   |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio) |
| Sen      | Sensibilidade   |
| SRDC     | Serviço de Referência em Doença de Chagas   |
| SRL      | Serviço de Referência em Leishmaniose   |
| SRNF     | Serviço de Referência Nacional em Filariose   |
| UFG      | Universidade Federal de Goiás   |
| UPE      | Universidade de Pernambuco  |
| UV       | Ultravioleta  |
| VN       | Verdadeiro negativo   |
| VP       | Verdadeiro positivo   |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|          |                          |
|----------|--------------------------|
| J        | Índice de Younden        |
| $\kappa$ | Índice de Kappa de Cohen |
| g        | Gramas                   |
| °C       | Graus Celsius            |
| kDa      | Quilodaltons             |
| $\mu$ g  | Micrograma               |
| $\mu$ l  | Microlitro               |
| mM       | Milimolar                |
| mm       | Milímetro                |
| min      | Minuto                   |
| ng       | Nanograma                |
| nm       | Nanômetro                |
| p        | Peso                     |
| %        | Porcentagem              |
| v        | Volume                   |

## SUMÁRIO

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>2</b>   | <b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Histórico da doença de Chagas.....</b>                                     | <b>25</b> |
| <b>2.2</b> | <b>O parasita.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Vias de transmissão.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Epidemiologia da doença de Chagas.....</b>                                 | <b>33</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Manifestações clínicas.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>2.6</b> | <b>Diagnóstico laboratorial.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>2.7</b> | <b>Estudos de validação de testes diagnósticos.....</b>                       | <b>54</b> |
| <b>3</b>   | <b>JUSTIFICATIVA.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>4</b>   | <b>HIPÓTESE.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>5</b>   | <b>OBJETIVOS.....</b>   | <b>59</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Objetivo geral.....</b>  | <b>59</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Objetivos específicos.....</b>   | <b>59</b> |
| <b>6</b>   | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>   | <b>60</b> |
| <b>6.1</b> | <b>Delineamento do estudo.....</b>  | <b>60</b> |
| 6.1.1      | Locais de experimentação e procedimentos.....                                 | 60        |
| 6.1.2      | Considerações éticas.....   | 60        |
| <b>6.2</b> | <b>Obtenção dos poliantígenos recombinantes.....</b>                          | <b>61</b> |
| 6.2.1      | Expressão e purificação.....  | 61        |
| 6.2.2      | Determinação da concentração.....   | 61        |
| 6.2.3      | Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio | 62        |
| <b>6.3</b> | <b>Padronização do ensaio imuno-enzimático indireto (ELISA indireto).....</b> | <b>62</b> |
| 6.3.1      | Seleção do sistema-tampão para sensibilização das microplacas.....            | 62        |
| 6.3.2      | Padronização dos componentes do ELISA indireto.....                           | 63        |
| 6.3.3      | Avaliação do SFB e do BSA como agentes bloqueadores.....                      | 65        |
| <b>6.4</b> | <b>Avaliação da estabilidade estrutural e funcional dos PRP-IBMP.....</b>     | <b>65</b> |
| 6.4.1      | Estabilidade a temperaturas extremas.....                                     | 65        |
| 6.4.2      | Estabilidade a temperatura ambiente.....                                      | 66        |
| 6.4.3      | Estabilidade de longa duração.....  | 66        |
| <b>6.5</b> | <b>População do estudo.....</b>   | <b>67</b> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 6.5.1      | Dimensionamento amostral.....   | 67        |
| 6.5.2      | Obtenção dos painéis sorológicos.....                                     | 67        |
| 6.5.3      | Definição do padrão-ouro e caracterização do painel sorológico.....       | 69        |
| 6.5.4      | Critérios de inclusão das amostras.....                                   | 70        |
| 6.5.5      | Critérios de exclusão.....  | 70        |
| <b>6.6</b> | <b>Expressão e análise dos resultados.....</b>                            | <b>71</b> |
| 6.6.1      | Definição do ponto de corte (CO - <i>cut-off</i> ) .....                  | 71        |
| 6.6.2      | Normalização dos dados.....   | 71        |
| 6.6.3      | Avaliação dos parâmetros de desempenho.....                               | 72        |
| 6.6.4      | Avaliação da reprodutibilidade.....                                       | 76        |
| 6.6.5      | Testes estatísticos.....  | 77        |
| <b>6.7</b> | <b>Avaliação do potencial diagnóstico dos PRP-IBMP.....</b>               | <b>77</b> |
| 6.7.1      | Estudo de fase I.....   | 77        |
| 6.7.2      | Estudo de fase II.....  | 78        |
| 6.7.3      | Sinergia entre os PRP-IBMP: mistura equimolar.....                        | 78        |
| 6.7.4      | Reações cruzadas.....   | 78        |
| 6.7.5      | Reprodutibilidade.....  | 79        |
| 6.7.5.1    | <i>Intraplaca (Repetitividade)</i> .....                                  | 79        |
| 6.7.5.2    | <i>Entre lotes</i> .....  | 79        |
| 6.7.5.3    | <i>Entre laboratórios</i> .....   | 79        |
| 6.7.6      | Concordância de desempenho com kits comerciais.....                       | 79        |
| 6.7.7      | Análise dos resultados inconclusivos.....                                 | 80        |
| <b>7</b>   | <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>81</b> |
| <b>7.1</b> | <b>SDS-PAGE.....</b>  | <b>81</b> |
| <b>7.2</b> | <b>Determinação da concentração.....</b>                                  | <b>81</b> |
| <b>7.3</b> | <b>Padronização do ELISA indireto.....</b>                                | <b>82</b> |
| 7.3.1      | Seleção do sistema-tampão para sensibilização das microplacas.....        | 82        |
| 7.3.2      | Padronização dos componentes do ELISA indireto.....                       | 83        |
| 7.3.3      | Avaliação do SFB e do BSA como agentes bloqueadores.....                  | 92        |
| <b>7.4</b> | <b>Avaliação da estabilidade estrutural e funcional dos PRP-IBMP.....</b> | <b>95</b> |
| 7.4.1      | Estabilidade a temperaturas extremas.....                                 | 95        |
| 7.4.2      | Estabilidade a temperatura ambiente.....                                  | 100       |
| 7.4.3      | Estabilidade de longa duração.....  | 106       |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>7.5</b> | <b>População do estudo.....</b>                                      | <b>109</b> |
| 7.5.1      | Dimensionamento amostral.....  | 109        |
| 7.5.2      | Definição do padrão-ouro.....  | 110        |
| 7.5.3      | Obtenção e caracterização dos painéis sorológicos.....               | 112        |
| <b>7.6</b> | <b>Avaliação do potencial diagnóstico dos PRP-IBMP.....</b>          | <b>112</b> |
| 7.6.1      | Estudo de fase I.....  | 112        |
| 7.6.2      | Estudo de fase II.....   | 115        |
| 7.6.3      | Sinergia entre os PRP-IBMP: misturas equimolares.....                | 122        |
| 7.6.4      | Reações cruzadas.....  | 126        |
| 7.6.5      | Reprodutibilidade.....   | 128        |
| 7.6.5.1    | <i>Intraplaca (Repetitividade).....</i>                              | <i>128</i> |
| 7.6.5.2    | <i>Entre lotes.....</i>  | <i>131</i> |
| 7.6.5.3    | <i>Entre laboratórios.....</i>                                       | <i>134</i> |
| 7.6.6      | Concordância de desempenho com kits comerciais.....                  | 137        |
| 7.6.7      | Análise dos resultados inconclusivos.....                            | 141        |
| <b>8</b>   | <b>DISCUSSÃO.....</b>  | <b>143</b> |
| 8.1        | Avaliação do perfil proteico.....                                    | 143        |
| 8.2        | Definição do padrão-ouro.....  | 144        |
| 8.3        | Avaliação do sistema-tampão para sensibilização das microplacas..... | 145        |
| 8.4        | Padronização e otimização dos componentes do ELISA.....              | 147        |
| 8.5        | Avaliação da estabilidade estrutural e funcional dos PRP-IBMP.....   | 148        |
| 8.6        | Avaliação da reprodutibilidade.....                                  | 151        |
| 8.7        | Estudo de Fase I.....  | 152        |
| 8.8        | Estudo de Fase II.....   | 154        |
| 8.9        | Sinergia entre os PRP-IBMP: mistura equimolar.....                   | 157        |
| 8.10       | Reações cruzadas.....  | 158        |
| 8.11       | Concordância de desempenho com kits comerciais.....                  | 159        |
| 8.12       | Análise dos resultados inconclusivos.....                            | 161        |
| <b>9</b>   | <b>CONCLUSÕES.....</b>   | <b>162</b> |
| <b>10</b>  | <b>PERSPECTIVAS.....</b>   | <b>164</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>165</b> |
|            | <b>APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO 1.....</b>                         | <b>191</b> |
|            | <b>APÊNDICE B – MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO 2.....</b>           | <b>192</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>APÊNDICE C – MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO 3.....</b> | <b>193</b> |
| <b>APÊNDICE D – MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO 4.....</b> | <b>194</b> |
| <b>APÊNDICE E – MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO 5.....</b> | <b>195</b> |
| <b>ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....</b>       | <b>196</b> |

---

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma zoonose provocada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, cuja via de transmissão clássica ocorre por meio de insetos hematófagos popularmente chamados de barbeiros, os quais eliminam as formas infectantes nas fezes e urina após realização do repasto sanguíneo. Estima-se atualmente que mais de cinco milhões de indivíduos sejam acometidos pela doença em todo o mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015), havendo 12.000 a 14.000 óbitos anuais em 21 países das Américas (HOTEZ et al., 2012; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 2014). Movimentos migratórios de indivíduos infectados de áreas endêmicas para países indenes do Pacífico Ocidental, da Europa, Oceania, e da América do Norte têm se tornado constantes e responsáveis pela expansão da doença para além das fronteiras da América Latina (COURA; VIÑAS, 2010). Dessa forma, há necessidade da elaboração de testes laboratoriais capazes de diagnosticar as diferentes linhagens do parasita circulantes nas diversas regiões geográficas.

O diagnóstico laboratorial da doença de Chagas representa um grande desafio para a Saúde Pública, pois depende da fase da doença e dos testes utilizados. Na fase crônica, em virtude dos elevados níveis séricos de imunoglobulinas anti-*T. cruzi* circulantes, as metodologias baseiam-se na interação antígeno-anticorpo, sendo a imunofluorescência indireta, a hemaglutinação indireta e o ensaio imunoenzimático (ELISA) as metodologias mais comumente utilizadas. Devido ao grande polimorfismo intraespecífico observado para as linhagens do parasita (TIBAYRENC, 2003), e a incapacidade de um único teste fornecer parâmetros de desempenho seguros para firmar o diagnóstico laboratorial da infecção, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a utilização em paralelo de dois testes com diferentes metodologias (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). No Brasil, direcionamentos do Ministério da Saúde definem que o diagnóstico pode ser realizado conforme o recomendado pela OMS ou utilizando dois testes com o mesmo princípio metodológico desde que possuam matrizes antigênicas distintas (BRASIL, 2005). Deste modo, resultados concordantes definem a condição sorológica de um indivíduo como negativo ou positivo. Por outro lado, resultados discordantes definem o estado sorológico como inconclusivo, devendo então buscar uma terceira alternativa metodológica para chegar a uma conclusão diagnóstica, levando em conta também as características clínico-epidemiológicas de cada indivíduo.



---

A dificuldade de se obter um resultado preciso utilizando um único teste pode ser atribuída aos antígenos utilizados na fase sólida. O ELISA convencional, por exemplo, utiliza extratos brutos ou antígenos semipurificados de cepas de *T. cruzi* que, em virtude de sua complexidade antigênica, resultam em problemas de padronização, baixa confiabilidade e possibilidade de reatividade cruzada com outros microrganismos, principalmente com espécies do gênero *Leishmania* (CORDERO et al., 2009; PAN et al., 1992; SANTOS et al., 2012). Na tentativa de diminuir estas limitações, antígenos recombinantes obtidos por meio de técnicas de engenharia genética passaram a compor a matriz antigênica dos testes diagnósticos. A avaliação de seu uso em sorodiagnóstico foi realizada por diferentes estudos, revelando elevados valores de sensibilidade e especificidade, sobretudo ausência de reação cruzada com outras patologias, uma vez que podem ser sintetizados a partir de sequências de DNA onde as regiões responsáveis por estas reações sejam identificadas e removidas (DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001; GOMES, LORENA, LUQUETTI, 2009; VERISSIMO DA COSTA et al., 2013). Alguns destes antígenos demonstraram possuir elevados parâmetros de desempenho por apresentarem em sua sequência repetições de aminoácidos aumentando, portanto, o seu reconhecimento pelo soro de indivíduos portadores da doença de Chagas, quando comparados aos extratos brutos do parasito (DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001). No entanto, devido à pouca variedade de epítomos (monotonia) apresentados por estes antígenos e ao elevado polimorfismo antigênico do *T. cruzi*, resultados falso-negativos continuaram a ser reportados (FRASCH et al., 1991).

Desta maneira, uma forma de aperfeiçoar o desempenho dos testes diagnósticos, reduzindo a possibilidade de reações falso-negativas e de reações cruzadas, foi a utilização de proteínas sintéticas formadas por epítomos conservados e repetitivos de diferentes proteínas em uma única molécula recombinante gerando um poliantígeno ou antígeno multi-epítomo, sendo também denominadas proteínas quiméricas (CAMUSSONE et al., 2009).

Neste sentido, uma avaliação sistemática de proteínas quiméricas pode permitir a seleção e/ou o desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico com melhores desempenhos, possibilitando inclusive o reconhecimento de cepas de diferentes regiões geográficas do Brasil e do mundo. Além disso, modificações na sequência linear das quimeras podem ser realizadas com o objetivo de obter um produto com elevado desempenho diagnóstico.

---

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

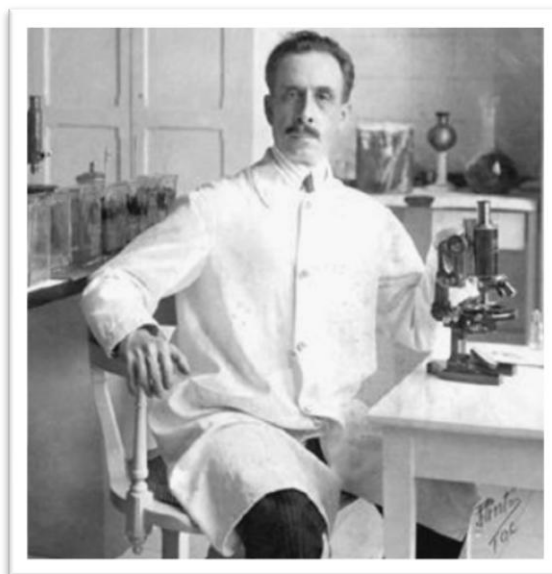
### 2.1 Histórico da doença de Chagas

A doença de Chagas foi descoberta em 1909 na cidade de Lassance, Minas Gerais, pelo pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934). Neste período, Carlos Chagas (Figura 1) foi designado pelo diretor do Instituto Oswaldo Cruz para combater uma epidemia de malária que acometia os trabalhadores da antiga Ferrovia Central do Brasil. Após instalar o seu laboratório no interior de um vagão, Carlos Chagas foi informado da existência de um inseto hematófago, popularmente denominado de barbeiro, habitando os domicílios, atacando o homem à noite e se escondendo em frestas das paredes e coberturas das casas durante o dia, sendo encontrado com mais frequência em habitações pobres, choupanas de paredes sem reboco e cobertas por capim. Estas observações aguçaram a curiosidade científica do pesquisador levando-o a encontrar protozoários flagelados no intestino médio do inseto (CHAGAS, 1909a). A esta nova espécie deu-se o nome de *Schizotrypanum cruzi*, atualmente denominado *Trypanosoma cruzi*, em homenagem ao seu mentor, o pesquisador Oswaldo Cruz (1872-1917) (CHAGAS, 1909b). Alguns exemplares infectados foram enviados ao Instituto Oswaldo Cruz para que fossem alimentados em saguis da espécie *Callithrix penicilata*, sendo os protozoários posteriormente isolados do sangue periférico destes animais (CHAGAS, 1909a). Além disso, a infecciosidade do protozoário foi confirmada em vários hospedeiros (coelhos, macacos e camundongos), os quais apresentaram formas parasitárias circulantes semelhantes àquelas encontradas nos insetos (CHAGAS, 1909a).

Chagas suspeitou que estivesse se deparado com um agente patogênico causador de infecção humana, mas não sabia qual doença era capaz de causar. A descoberta veio em seguida ao analisar o sangue de uma criança de dois anos de idade, chamada Berenice, que habitava uma residência repleta de barbeiros e apresentava sintomas inespecíficos como febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (CHAGAS, 1909a). Foi observada uma grande quantidade de formas flageladas do *T. cruzi* semelhantes àquelas detectadas previamente no sangue de primatas experimentalmente infectados. Assim, Carlos Chagas teve a oportunidade de ser o primeiro pesquisador a descrever um caso clínico da doença. Nos anos seguintes, ele ainda descreveu os aspectos clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos da doença, além de documentar a presença do parasita em triatomíneos, relatando algumas espécies

transmissoras do parasita e alguns reservatórios silvestres, deixando uma grande contribuição à ciência (GOLDBAUM; BARRETO, 2008). Apesar de receber o mérito por seu descobrimento, outros pesquisadores contribuíram de sobremaneira para melhor entendimento da biologia do parasita e da doença por ele causada. A identificação e caracterização do *T. cruzi* foi resultado da colaboração de Oswaldo Cruz com o zoologista e parasitologista checo Stanislaus von Prowazek (1875-1915) (STEVERDING, 2014). O estágio intracelular presente no ciclo de vida do parasita foi descrito pelo patologista brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna (1885-1914), tanto em células musculares cardíacas quanto esqueléticas (VIANNA, 1911). A via de transmissão do *T. cruzi* foi estabelecida pelo parasitologista francês Alexandre Joseph Émile Brumpt (1877-1951) ao demonstrar que a infecção não é resultante da inoculação direta do parasita, como anteriormente pensado por Carlos Chagas, mas sim pela sua introdução através da ferida ocasionada pela picada do hematófago durante o repasto sanguíneo (BRUMPT, 1912).

**Figura 1** - Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas



**Fonte:** Steverding (2014).

**Nota:** Carlos Chagas em seu laboratório no Instituto Soroterápico Federal de Manguinhos, Rio de Janeiro. O pesquisador brasileiro identificou o protozoário parasita *T. cruzi* como agente etiológico da doença de Chagas.

## 2.2 O parasita

O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado do super-reino Metakaryota, reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida e pertencente à família Trypanosomatidae (CAVALIER-SMITH, 1993; CAVALIER-SMITH, 2010; HONIGBERG, 1963). Nesta ordem são encontrados parasitas com um ou dois flagelos que se originam a partir de uma abertura conhecida como bolsa flagelar, normalmente contendo uma estrutura paraflagelar e outra, proeminente, que corresponde a uma condensação do DNA (kDNA), localizado no interior de uma mitocôndria única, conhecida como cinetoplasto (MASLOV; PODLIPAEV; LUKES, 2001).

O gênero *Trypanosoma* é importante dentro da família Trypanosomatidae por incluir outras espécies causadoras de doenças nos seres humanos e em animais, tais como o *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono (BARRETT et al., 2003). A primeira revisão taxonômica para designação genérica foi realizada em 1939, com mudança de *Schizotrypanum cruzi* para *Trypanosoma cruzi*. Em 1966, os tripanossomatídeos parasitas de mamíferos foram divididos em duas seções, *Salivaria* e *Stercoraria*, sendo o *T. cruzi* incluído nesta última (HOARE; WALLACE, 1966) e permanecendo até hoje. A seção *Salivaria* compreende os tripanosomas africanos transmitidos pela mosca tsé-tsé (STEVENS; GIBSON, 1999). Por outro lado, a *Stercoraria* inclui os tripanosomas que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, progredindo para formas metacíclicas, as quais são liberadas nas fezes do inseto infectado. Apesar desta divisão, análises filogenéticas sugerem que o gênero *Trypanosoma* seja monofilético (STEVENS et al., 2001). Além disso, estimativas realizadas por relógio molecular sugerem que o *T. cruzi* e o *T. brucei* compartilhavam um ancestral comum há cerca de 100 milhões de anos atrás (STEVENS et al., 1999), comprovando a hipótese do supercontinente do sul na biogeografia de vicariância do *Trypanosoma*, a qual refere-se ao mecanismo evolutivo em que uma área biótica se fragmenta (HAMILTON et al., 2012).

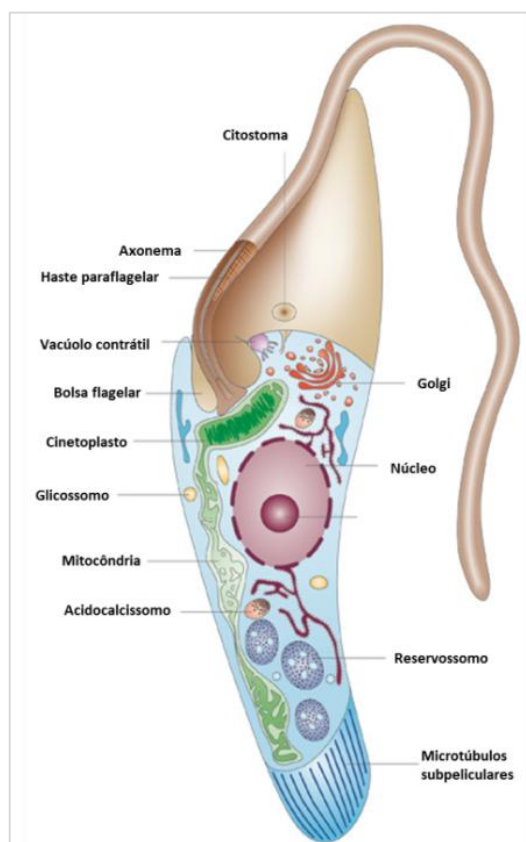
O *T. cruzi* possui um núcleo oval, muitas organelas observadas em outros eucariotos e um flagelo em sua extremidade anterior (Figura 2) (SOARES et al., 1989; SOUZA, 2008). O núcleo apresenta variação morfológica entre as fases replicativas e infectivas. Nas primeiras, apresenta-se esférico com pouca heterocromatina e nucléolo evidente, diferentemente das formas infectivas nas quais torna-se alongado, abundante em heterocromatina e com ausência de nucléolo. A estas diferenças atribui-se a taxa transcricional característica de cada fase,

---

sendo que nas formas epimastigotas e amastigotas ocorre intensa transcrição, ao passo que nas formas tripomastigotas metacíclica e sanguícola a transcrição reduz a níveis basais (ELIAS et al., 2001). Dentre as organelas muitas são peculiares ou diferenciadas de outros eucariotos, como os glicosossomos, acidocalcissomos e reservossomos, os quais são estruturas esféricas e vesiculares relacionadas a vias metabólicas (OPPERDOES; BORST, 1977; SOUZA, 2008), armazenamento (DOCAMPO et al., 1995; DOCAMPO; MORENO, 2008) e degradação proteica (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009; SOARES et al., 1989), respectivamente. Com relação à membrana plasmática, observa-se em sua face interna uma camada de microtúbulos paralelos entre si e interconectados através de filamentos especializados, conferindo resistência mecânica e rigidez ao parasita (KOHL; GULL, 1998). Já em sua face externa é encontrada uma camada de glicoconjugados ligada a ela por meio de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo muitas destas relacionadas à interação parasita-hospedeiro (HEISE et al., 1996). O flagelo é único e necessário para locomoção, divisão celular e morfogênese do protozoário. Estruturalmente é formado por uma haste paraflagelar constituída de um arranjo complexo de filamentos paralelos ao seu eixo, a qual ancora o flagelo ao axonema e à zona de ligação (DE SOUZA; SOUTO-PADRÓN, 1980; SABORIO et al., 1989). Esta zona, por sua vez, é composta por uma rede de filamentos e conexões de membrana que unem o flagelo ao longo do corpo celular do parasita (ROCHA et al., 2006).

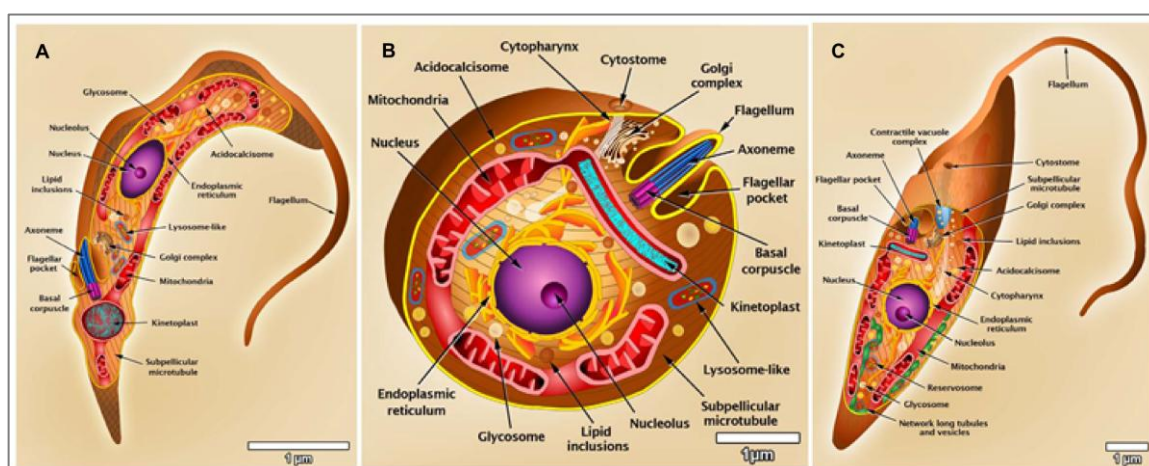
O *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas distintas em seu ciclo de vida, sendo a localização do cinetoplasto um dos critérios utilizados para a sua diferenciação. A tripomastigota é a forma extracelular, não replicativa e infectiva, encontrada no intestino posterior do triatomíneo e ao final do desenvolvimento do parasita no interior da célula do mamífero, imediatamente antes da lise, assim como na corrente sanguínea. É caracterizada por apresentar cinetoplasto localizado na região posterior do parasita, com uma forma mais arredondada devido à diminuição do grau de condensação do kDNA (Figura 3A). A amastigota é a forma intracelular replicativa do protozoário, sendo encontrada no interior das células dos hospedeiros mamíferos. Apresenta o cinetoplasto de maneira muito semelhante aos epimastigotas e morfologicamente possui característica esférica ou oval sem flagelo livre visível ao microscópio óptico (Figura 3B). Já a epimastigota é a forma extracelular replicativa presente no tubo digestivo do inseto vetor e também em cultivos axênicos. Esta forma apresenta cinetoplasto em forma de bastão em posição anterior ao núcleo, constituído por um material filamentoso organizado em feixes de fibras fortemente empacotados e perpendicularmente orientados ao eixo longitudinal do parasita (Figura 3C).

**Figura 2** - Representação esquemática de um *T. cruzi* na forma epimastigota



**Fonte:** Docampo et al. (2005, tradução nossa).  
**Nota:** Seção longitudinal.

**Figura 3** - Representação esquemática das formas do *T. cruzi*



**Fonte:** Modificada de Teixeira et al. (2012).

**Nota:** (A) Forma tripomastigota; (B) Forma amastigota; (C) Forma epimastigota.

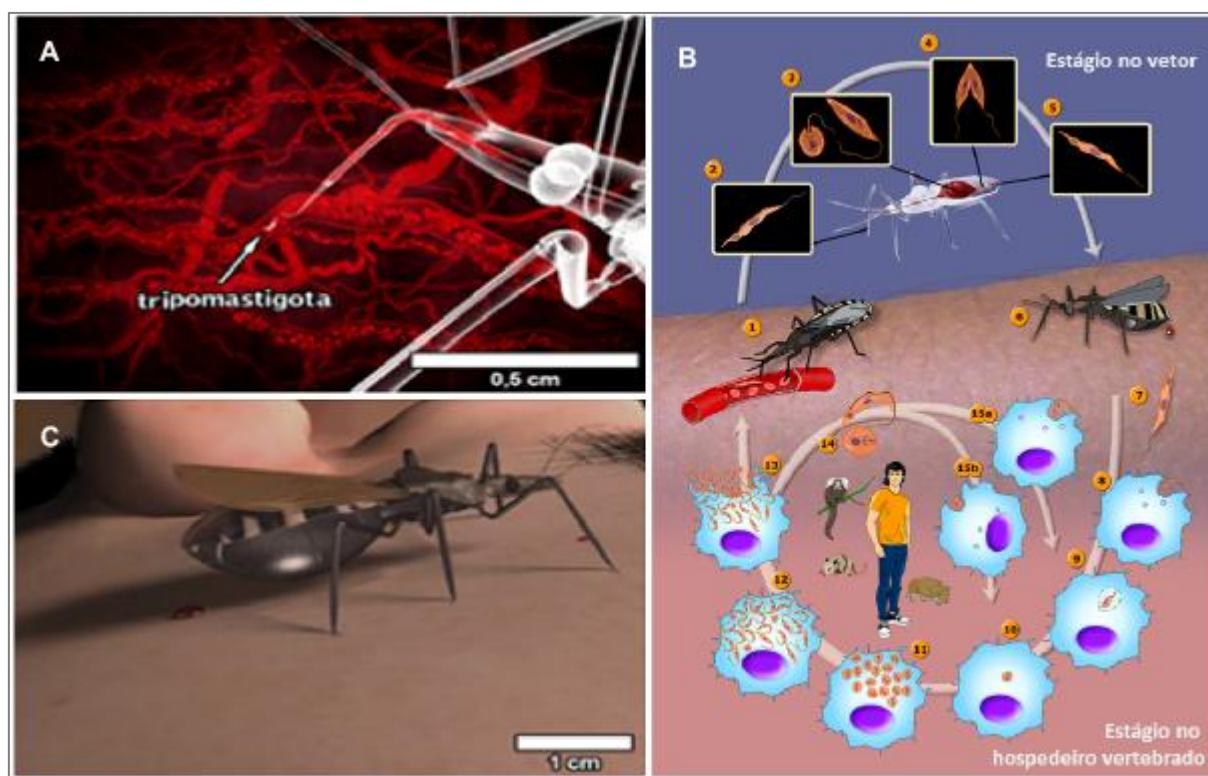
### 2.3 Vias de transmissão

As principais vias de transmissão da doença de Chagas são a vetorial, transfusional, congênita, oral, por transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais. Dentre estas, a vetorial ganha destaque por ser responsável pela maior parte do contingente de infectados em todo o mundo, ainda que sua importância venha declinando paulatinamente em decorrência do controle vetorial e da melhoria das condições de habitação em áreas de ocorrência da doença (MONTROYA; DIAS; COURA, 2003). Contudo, a despeito de seu declínio, esta é considerada a forma clássica de transmissão da doença, a qual ocorre através de vetores hematófagos pertencentes a ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (DIAS et al., 2000). Os gêneros mais comumente envolvidos com a transmissão vetorial são o *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, popularmente conhecidos como barbeiros, procotós, chupanças, bicudos ou chupões. O ciclo de vida heteroxênico é iniciado quando o triatomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, ingere a forma tripomastigota circulante (Figuras 4A e 4B etapa 1). No vetor, o protozoário sofre diferenciação para a forma epimastigota e se multiplica intensamente em seu tubo digestivo (Figura 4B etapas 2-4). Ao final deste período, as formas epimastigotas migram para a porção terminal do intestino do vetor e evoluem para a forma tripomastigota infectante ou metacíclica (Figura 4B etapa 5). Ao realizar um novo repasto sanguíneo, o triatomíneo libera juntamente com suas excretas as formas infectantes do parasita, podendo ocorrer infecção através de sua introdução pela solução de continuidade recém-formada da pele ou da mucosa (Figuras 4B etapa 6 e 4C). No mamífero, após fagocitose dos tripomastigotas metacíclicos recém-adquiridos ocorre diferenciação para a forma amastigota (Figura 4B etapas 7-9), sendo esta última capaz de escapar dos vacúolos parasitóforos (Figura 4B etapa 10). No citoplasma, as amastigotas multiplicam-se intensamente (Figura 4B etapa 11) e se diferenciam novamente para a forma tripomastigota (Figura 4B etapa 12). Ao longo do processo a célula se rompe liberando amastigotas e tripomastigotas para o meio externo (Figura 4B etapa 13). Novas células poderão ser infectadas a partir daí (Figura 4B etapa 15) ou os tripomastigotas circulantes poderão ser ingeridos por novos insetos vetores (Figura 4B etapa 14), fechando o ciclo de vida do *T. cruzi*.

A via transfusional teve grande declínio após a regulamentação de triagem sorológica em bancos de sangue. Entretanto, este mecanismo ganhou importância devido ao fluxo migratório de indivíduos infectados de áreas endêmicas para áreas indenes, uma vez que nos

países de destino não há regulamentação da triagem sorológica para a doença de Chagas nos bancos de sangue (COURA; VIÑAS, 2010). No Brasil, o Ministério da Saúde define que a triagem sorológica de doadores de sangue seja realizada por pelos menos dois exames com metodologias distintas (BRASIL, 2005).

**Figura 4** - Representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi*



**Fonte:** Modificada de Teixeira et al. (2012).

**Nota:** (A) Inseto vetor ingerindo tripomastigota circulante durante repasto sanguíneo (B) 1. O inseto vetor pica um hospedeiro mamífero e ingere tripomastigotas sanguíneos. 2. Tripomastigotas metacíclicos. 3. Tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas. 4. Epimastigotas multiplicam-se no intestino médio do vetor. 5. Epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos. 6. O inseto vetor elimina a forma infectante do parasita nas fezes durante o novo repasto sanguíneo. 7. Forma tripomastigota metacíclica. 8. Tripomastigota metacíclica infecta macrófagos. 9. Tripomastigotas metacíclicos diferenciam-se em amastigotas. 10. Amastigotas escapam dos vacúolos parasitóforos. 11. Amastigotas multiplicam no citoplasma. 12. Amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas. 13. Os tripomastigotas rompem as células infectadas. 14. Formas amastigotas e tripomastigotas. 15 (a). Tripomastigotas e (b) amastigotas infectam novos macrófagos. Na parte central da figura estão ilustrados alguns reservatórios envolvidos com a manutenção do parasita no ambiente doméstico e peridoméstico. (C) Durante repasto sanguíneo tripomastigotas metacíclicos podem ser eliminados nas fezes ou urina do inseto vetor.

A transmissão congênita recebeu maior notoriedade devido a redução do número de casos pelas transmissões vetorial e transfusional, mudando o panorama epidemiológico da doença. O risco de transmissão por esta via é estimado em 0,1% a 12%, podendo sofrer influência do nível de parasitemia materna, da cepa do parasita, da existência de lesões



---

placentárias e da região geográfica avaliada (BRASIL, 2005; DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011; NISIDA et al., 1999). No entanto, esta via pode ser controlada ao estimular a prática da realização do exame pré-natal com identificação prévia de mães infectadas e posterior tratamento e acompanhamento dos recém-nascidos (RUSSOMANDO et al., 2005).

A transmissão oral é considerada um mecanismo primário, principalmente no ciclo silvestre da tripanossomíase. Diversos mecanismos estão relacionados a esta via como, por exemplo, aleitamento materno, ingestão de sangue de mamífero infectado, ingestão de carne mal cozida de mamíferos infectados (especialmente de reservatórios silvestres – caças), ingestão de alimentos e bebidas contendo fezes, urina ou pedaços triturados de triatomíneos infectados e ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com urina ou secreção para-anal de marsupiais infectados pelo *T. cruzi* (DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011; TOSO; VIAL; GALANTI, 2011). Diversos surtos de transmissão oral já foram registrados no Brasil (ANDRADE et al., 2011; CAMANDAROBA; PINHEIRO LIMA; ANDRADE, 2002; DE SOUZA et al., 1988; PINTO et al., 2001; RODRIGUEZ-MORALES, 2008; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; STEINDEL et al., 2008; VALENTE et al., 1998). Os principais alimentos relacionados a esta via são o caldo de cana, o suco de açaí, goiaba ou de bacaba, o vinho da palma e a carne de animais de caça (TOSO; VIAL; GALANTI, 2011).

O transplante de órgãos, especialmente o renal, hepático, cardíaco, de medula óssea e de pâncreas, já foi documentado como via para aquisição da infecção (DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011; KRANSDORF; ZAKOWSKI; KOBASHIGAWA, 2014). Em virtude do transplante ser usualmente um procedimento prioritário, caracterizado por emergência clínica, histocompatibilidade e disponibilidade do órgão, procura-se priorizar o ato cirúrgico fazendo uma criteriosa avaliação sorológica de doadores e receptores. Neste caso, a ação a ser tomada baseia-se na atenção médico-laboratorial no pós-operatório para detecção de eventual reativação devida à imunossupressão. Caso isto aconteça o tratamento antiparasitário deve ser iniciado imediatamente minimizando, desta forma, os riscos de cardite aguda e/ou meningoencefalite (DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011).

Apesar de documentado na literatura, a transmissão acidental da doença de Chagas foi descrita em pouco mais de 50 casos (HERWALDT; JURANEK, 1993; HOFFLIN et al., 1987). Os acidentes têm ocorrido nas mais diversas situações, seja em laboratórios de triatomíneos, seja na captura do vetor em áreas endêmicas, ou em trabalhos experimentais com mamíferos infectados, culturas ou em aerossóis de materiais contaminados (DIAS et al., 2011). Há também o relato de casos de infecção a partir de pacientes agudos durante cirurgias

---

ou transporte de materiais contaminados (BRENER; ALQUEZAR; LUQUETTI, 1997; DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011). A prevenção desta via passa pelas instâncias primária (evitando o acidente) e secundária (minimizando as consequências do acidente).

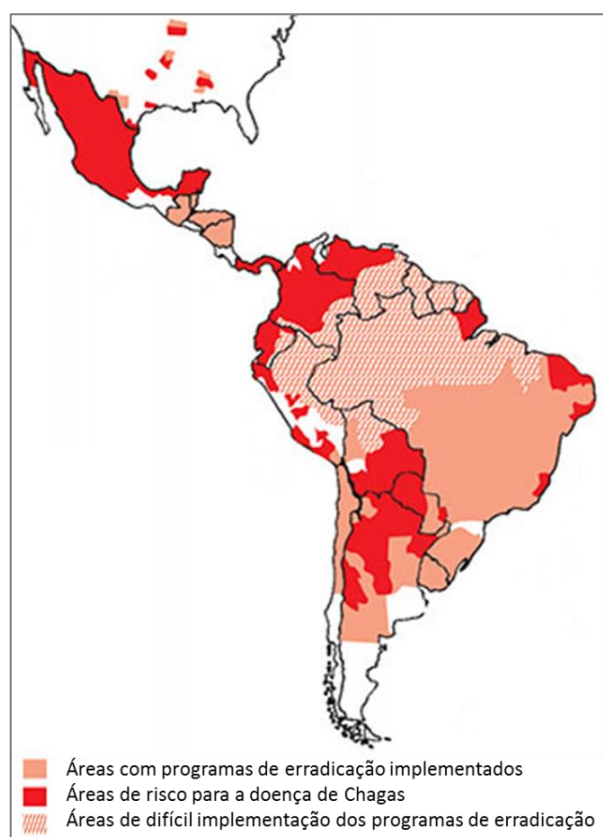
## 2.4 Epidemiologia da doença de Chagas

Apesar de ter sido descoberta há mais de cem anos, a doença de Chagas ainda representa uma ameaça à Saúde Pública. Sua distribuição, incluindo os reservatórios e vetores, estende-se do sudeste dos Estados Unidos ao sul do Chile e Argentina, expondo 75-90 milhões de indivíduos ao risco de adquirir a infecção (COURA; DIAS, 2009) (Figura 5). Com 28 mil novos casos a cada ano e 12 a 14 mil óbitos anuais a doença de Chagas é considerada a mais importante doença parasitária das Américas (HOTEZ et al., 2012; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 2014). No entanto, a despeito dos números alarmantes, houve redução significativa da estimativa do número de indivíduos cronicamente infectados de 15 milhões em 2002 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002) para 8 milhões em 2014 (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 2014) e 5,7 milhões em 2015 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015), a qual deve-se à melhoria da qualidade de vida em áreas rurais, programas de combate ao vetor e regulamentação da triagem sorológica em bancos de sangue.

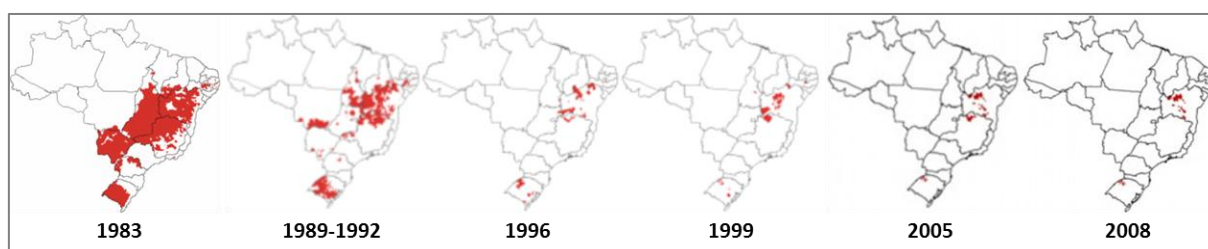
Mais de 130 espécies de barbeiro já foram descritas como vetores em potencial para a transmissão do *T. cruzi* (SCHOFIELD, 2000). No Brasil, 52 espécies foram relatadas, mas somente cinco, por possuírem hábitos domésticos, apresentam importância epidemiológica. As demais são silvestres e mantêm o ciclo com mamíferos em seu ambiente natural. O *Triatoma infestans*, é a única espécie com hábitos estritamente domésticos, exceção feita a uma população descrita na região central da Bolívia (Sucre/Cochabamba) que possui hábitos silvestres vivendo em buracos nas pedras e mantendo o ciclo com porquinhos da índia (SCHOFIELD, 2000). Em julho de 1991, os governos da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, que compartilhavam entre si alta endemicidade para a doença de Chagas e a presença do *T. infestans* como a principal espécie vetora, uniram esforços e aprovaram a resolução 04-3 sobre o Controle de Enfermidades Zoonóticas, criando-se assim a Comissão Intergovernamental de Doença de Chagas, um programa pioneiro mais comumente conhecido como Iniciativa do Cone Sul (SCHOFIELD; DIAS, 1999; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). O seu objetivo principal focava a interrupção da transmissão vetorial através

---

da eliminação do *T. infestans* e outras espécies domiciliadas e da transmissão transfusional através da implantação de triagem sorológica em bancos de sangue. Assim, as atividades de eliminação do vetor apontaram redução na incidência da infecção em crianças e adultos jovens em 60% no Paraguai, 99% no Uruguai e de 94% quando os seis países são analisados conjuntamente (MONCAYO, 1999; SCHMUNIS; ZICKER; MONCAYO, 1996). Enquanto que, a Venezuela, país igualmente endêmico para a doença de Chagas, mas que não participou da Iniciativa, apontou redução de apenas 0,1% para o mesmo período analisado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). No Brasil, as ações do programa proporcionaram redução de 95% no número de novos casos (CAMARGO et al., 1984; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000), o que pode ser comprovado analisando a mudança no perfil de distribuição do *T. infestans* desde 1983 (Figura 6) ou a diminuição do registro de novos casos (SANTOS et al., 2015). Desta forma, o Uruguai, o Chile e o Brasil foram declarados áreas livres de transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans* em 1997, 1999 e 2006, respectivamente. Para os demais países participantes, a eliminação do *T. infestans* ainda encontra-se em andamento. O sucesso da Iniciativa Cone Sul estimulou países da América Central a combater a principal espécie de vetor da região, o *Rhodnius prolixus*. Até o momento, resultados positivos foram atingidos em El Salvador e na Guatemala (SCHMUNIS, 2007).

**Figura 5** - Distribuição geográfica da doença de Chagas

**Fonte:** Modificada de International Association for Medical Assistance to travellers (2012, tradução nossa).

**Figura 6** - Impacto das ações de controle sobre a doença de Chagas no Brasil

**Fonte:** Modificada de Doença... (2015).

**Nota:** Série histórica da distribuição do *T. infestans* no Brasil.

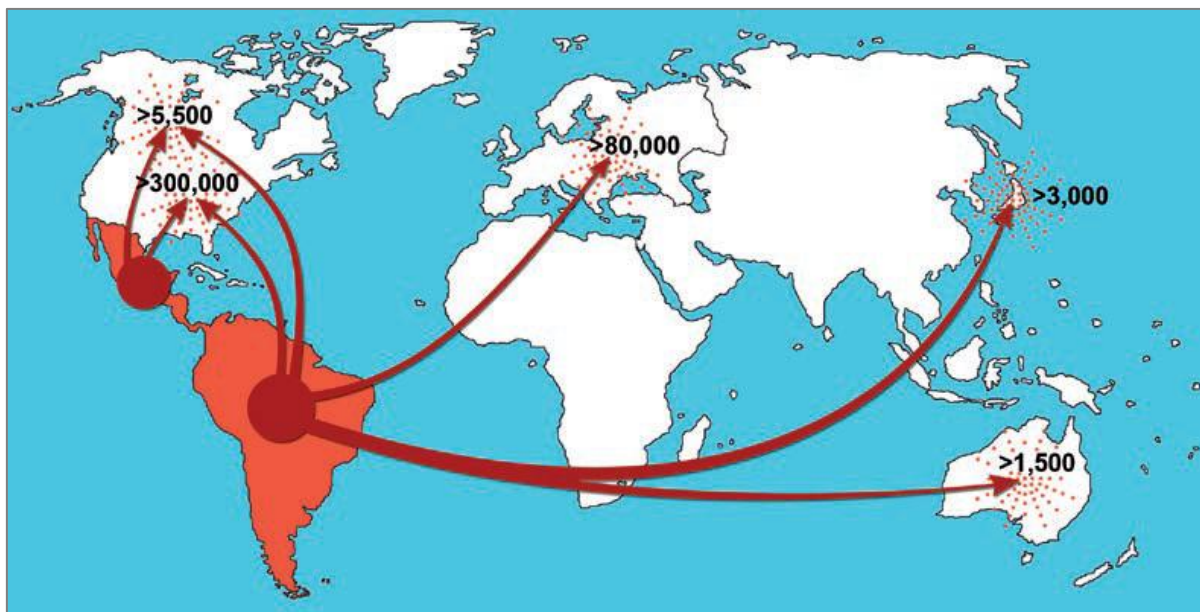
Apesar da remissão de novos casos da doença por transmissão vetorial na maioria dos países da América do Sul, a infecção pelo *T. cruzi* representa um risco global. Espécies de triatomíneos foram encontradas ao longo das regiões costeiras da África, Oriente Médio, sudeste da Ásia e regiões ocidentais do Pacífico, tendo se espalhado através do comércio marítimo da América Latina desde o início do século XVI (COURA; VIÑAS, 2010). Além

---

disso, há possibilidade de disseminação do vetor através de rotas aéreas aumentando a chance de transmissão fora da América Latina (COURA, 2007). Um exemplo disso foi a verificação da presença maciça do *Triatoma rubrofasciata* na região peridomiciliar de cidades do Vietnã, com relatos de ataques ao ser humano. Este fato aponta a necessidade de implementação de vigilância entomológica também em localidades fora da América Latina (DUJARDIN et al., 2015).

De forma semelhante, o *T. cruzi* pode se disseminar através dos movimentos populacionais de países endêmicos para áreas indenes. Assim, a infecção já foi descrita na América do Norte (Estados Unidos e Canadá) (BERN; MONTGOMERY, 2009; STEELE et al., 2007), região oeste do Pacífico (Japão e Austrália) (IMAI et al., 2014; JACKSON; PINTO; PETT, 2014; PINTO; PETT; JACKSON, 2014; UENO et al., 1995) e Europa, principalmente na Bélgica (CARLIER, 2011), Espanha (MUÑOZ et al., 2007; PIRON et al., 2008), França (BRUTUS et al., 2009; SALAMANCA-DEJOUR et al., 2012), Itália (ANGHEBEN et al., 2011), Reino Unido (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009) e Suíça (JACKSON et al., 2009; MARTINEZ DE TEJADA et al., 2009), e em menor escala na Alemanha (FRANK et al., 1997), Áustria, Croácia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Romênia e Suécia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). Estima-se que haja mais de 300 mil indivíduos infectados pelo *T. cruzi* nos Estados Unidos, mais de 5.500 no Canadá e na região do Pacífico ocidental, mais de 80 mil na Europa, mais de 3.000 no Japão e mais de 1.500 na Austrália (SCHMUNIS, 2007; SCHMUNIS; YADON, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009) (Figura 7). Estas migrações criaram novos desafios epidemiológicos, econômicos, sociais e políticos. Em países com ausência de vetores naturais, as principais ameaças são as transfusões de sangue contaminado, transmissão vertical, por meio de transplante órgãos e, em menor escala, acidentes de laboratório, demonstrando a necessidade de aperfeiçoar o sistema de vigilância epidemiológica, de fornecer assistência médica aos portadores da doença de Chagas em países não endêmicos, de interceptar a transmissão vertical e de realizar controles adicionais nos bancos de sangue e transplante de órgãos com realização de diagnóstico diferencial. A doença de Chagas tornou-se mais do que uma doença zoonótica que afeta as populações rurais de países endêmicos, consistindo atualmente uma preocupação mundial que pode ter consequências para a saúde humana em longo prazo.

**Figura 7** - Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos



**Fonte:** Coura; Viñas (2010).

Como mencionado anteriormente, a transmissão oral é bem conhecida e já foi descrita por vários autores (ANDRADE et al., 2011; CAMANDAROBÁ; PINHEIRO LIMA; ANDRADE, 2002; DE SOUZA et al., 1988; PINTO et al., 2001; RODRIGUEZ-MORALES, 2008; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; STEINDEL et al., 2008; VALENTE et al., 1998). Uma importante característica desta via é a possibilidade de diversos indivíduos serem afetados simultaneamente ao ingerir a mesma fonte de contaminação. Esta rota de infecção encontra-se atualmente em evidência, em especial em municípios da região norte do Brasil, Guiana Francesa e Venezuela onde o consumo de produtos derivados do açaí é um hábito comum da população (BLANCHET et al., 2014; DE NOYA et al., 2015; DE NOYA; GONZÁLEZ, 2015; DE SOUZA et al., 1988; PINTO et al., 2001; VALENTE et al., 1998).

## 2.5 Manifestações clínicas

De acordo com suas características laboratoriais e manifestações clínicas, a doença de Chagas é dividida em duas fases distintas. A primeira delas, a aguda, é de curta duração, variando de um a três meses. Clinicamente pode ser sintomática ou não. Quando sintomática, as manifestações aparecem 7 a 10 dias após a infecção (BARRETT et al., 2003) e, em geral, são inespecíficas, como febre, edema localizado ou generalizado, cefaléia e mal-estar geral. O

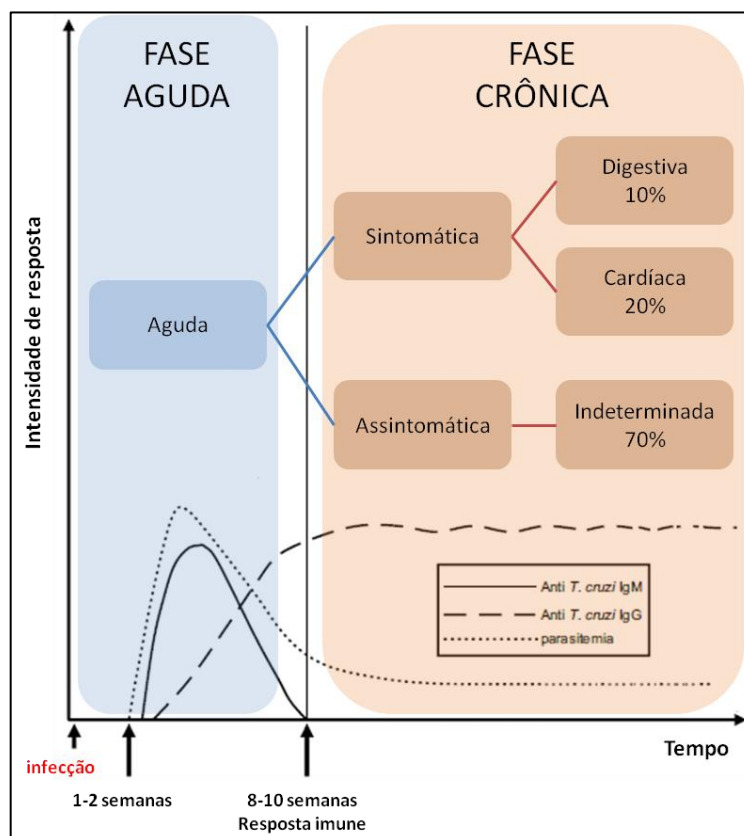
---

chagoma de inoculação e o sinal de Romaña, edema uni ou bi-palpebral, representam manifestações locais que ocorrem conforme a entrada do parasita, mas nem sempre são evidentes. Manifestações sistêmicas como alterações nervosas, esplenomegalia, hepatomegalia e erupção cutânea podem estar presentes durante esta fase. Miocardite, efusão pericardial ou meningoencefalite estão relacionados a doença aguda severa e óbito, ocorrendo em menos de 1% dos infectados (BERN; MARTIN; GILMAN, 2011; NUNES et al., 2013; PRATA, 2001). Durante a fase aguda, tripomastigotas podem ser facilmente detectados no sangue periférico (BARRETT et al., 2003; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). A fase aguda termina quando o sistema imunológico reduz o número de tripomastigotas circulantes, tornando, muitas vezes, o diagnóstico parasitológico negativo (Figura 8).

Posteriormente, os indivíduos infectados tornam-se assintomáticos, com eletrocardiograma e estudo radiológico de coração, esôfago e cólon normais, mas com sorologia positiva (MARIN-NETO et al., 2002; RIBEIRO; ROCHA, 1998). A esta nova fase dá-se o nome de forma crônica indeterminada (Figura 8). Nela, os indivíduos infectados apresentam bom prognóstico e a sua expectativa de vida é similar àquela observada para os indivíduos não infectados (DIAS, 1989; MARIN-NETO et al., 2002; PRATA, 2001). Entretanto, 15-30% desenvolvem sintomatologia décadas após a infecção inicial (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; PRATA, 2001). As manifestações clínicas desta fase estão relacionadas ao envolvimento patológico de órgãos específicos, particularmente coração, esôfago e cólon, os quais são agrupados em três formas principais da doença: cardíaca, digestiva e cardio-digestiva ou mista (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO; SIMÕES; RASSI JR, 2010). A forma cardíaca, devido à sua frequência e severidade, é a mais importante da doença de Chagas crônica, sendo caracterizada por insuficiência cardíaca congestiva. Bloqueio de ramo direito e aneurisma apical do ventrículo esquerdo são as alterações mais comumente encontradas (MAGUIRE et al., 1987; NUNES et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013). A forma digestiva é definida pela dilatação de vísceras ocas, com formação das megavísceras, sendo mais comumente descritas no cólon e esôfago. A sua formação está relacionada com a degeneração plexular ou denervação pós-ganglionar parassimpática intrínseca, levando a uma hipertrofia muscular e hiperplasia da mucosa, ambas responsáveis pelas visceromegalias (GUEVARA et al., 1997; GULLO et al., 2012). Disfagia e constipação são as manifestações mais frequentemente

descritas nos indivíduos com megaesôfago e megacólon, respectivamente (GULLO et al., 2012).

**Figura 8** - Evolução clínica da doença de Chagas



**Fonte:** Modificada de Dutra et al. (2009) e de Rassi Jr; Rassi; Marcondes de Rezende (2012).

## 2.6 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção causada pelo *T. cruzi* não é uma tarefa fácil dadas as características da doença. Assim, o diagnóstico depende de sua fase sendo que, na aguda, em virtude da grande quantidade de parasitas circulantes, as metodologias utilizadas são aquelas que evidenciam a presença destes por meio de exames parasitológicos diretos e indiretos (GOMES, 1997; MURCIA et al., 2013). Os indivíduos elegíveis para realização de exames parasitológicos são os recém-nascidos de mães infectadas, indivíduos imunossuprimidos com diagnóstico prévio da doença e aqueles com suspeita clínica e epidemiológica de ter adquirido recentemente a infecção. Dentre os métodos parasitológicos diretos, os mais utilizados são a microscopia da gota fresca de sangue examinada entre lâmina



e lamínula e a gota espessa corada, sendo este último menos sensível que o primeiro (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). Desde os anos 1960, o diagnóstico parasitológico da fase aguda vem sendo aperfeiçoado com procedimentos de enriquecimento, sendo as metodologias de micro-hematócrito (FEILIJ; MULLER; GONZALEZ CAPP, 1983) e de Strout (STROUT, 1962) as mais corriqueiramente empregadas. Podem também ser utilizados os métodos parasitológicos indiretos, os quais baseiam-se no aumento do número de parasitas provenientes do sangue ou líquido, em passagens por triatomíneos (xenodiagnóstico), meios de cultivo ou sub-inoculação em modelos experimentais (LUQUETTI; RASSI, 2000; SIQUEIRA-BATISTA et al., 1996; STORINO; MILEI, 1994). Em geral, são metodologias que necessitam de 30 a 60 dias para a demonstração do parasita nas fezes do inseto, no meio de cultivo ou no sangue/tecidos dos animais inoculados. Apesar não conferirem diagnóstico específico para a fase aguda, observa-se que o número de parasitas recuperados é maior quando comparadas à crônica, além de apresentarem positividade precoce quando o material biológico é coletado dez a quinze dias pós-infecção (DIAS, 1990). Em contraste, as técnicas sorológicas indiretas apresentam baixa sensibilidade em indivíduos recentemente infectados devido ao tempo mínimo requerido para a produção de IgG anti-*T. cruzi* (Figura 8). Além disso, mesmo a IgM anti-*T. cruzi* requer um período de semanas para ser produzida a níveis detectáveis. Outro problema é a ausência de kits comerciais para detecção desta imunoglobulina, o que impede a utilização de testes sorológicos como método de diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda (LUQUETTI; SCHMUNIS, 2010).

Com a evolução clínica, inicia-se a fase crônica, aumentando a produção de anticorpos específicos dirigidos para diferentes estruturas do microrganismo (Figura 8), os quais passam a ser detectados por testes imunológicos (SCHATTSCHEIDER et al., 1992). Os mais regularmente utilizados são o ensaio imunoenzimático (*enzyme linked-immunosorbent assay* – ELISA), a imunofluorescência indireta (IFI) e a hemaglutinação indireta (HAI) (BRASIL, 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). Além destes, o Western blot, a radioimunoprecipitação (RIPA), a quimioluminescência, a imunocromatografia (testes rápidos), a aglutinação em partículas de látex, a citometria de fluxo e o microarranjo líquido já foram descritos na literatura como metodologias para o diagnóstico da doença de Chagas, bem como ferramentas moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes.

O teste de IFI foi o primeiro método a ser desenvolvido (FIFE; MUSCHEL, 1959; DE SOUZA; CAMARGO, 1966), empregando epimastigotas fixadas em formalina. São

---

utilizados anticorpos anti-imunoglobulina humana marcados com fluoresceína para a detecção de anticorpos que se fixam sobre os epimastigotas após reação com o soro de interesse. Apresenta o inconveniente de necessitar microscópio de fluorescência, além de apresentar reações cruzadas para outras espécies, em especial *Leishmania sp.*, *Trypanosoma rangeli*, epítomos contendo fosfocolina (LAL; OTTESEN, 1989) e uma série de auto-anticorpos (VELÁSQUEZ et al., 1993). Além do mais, a interpretação dos resultados é subjetiva, sendo propícia a diferentes conclusões quando mais de um analista realiza a leitura final do teste. A HAI é um dos testes mais utilizados para o diagnóstico imunológico para a doença de Chagas. O princípio consiste na fixação de componentes proteicos do *T. cruzi* na superfície de hemácias mediante adição de ácido tânico ou de cloreto de cromo. A identificação de reatividade pode ser visualizada após formação de aglutinação no fundo do tubo, sendo decorrente da mistura das hemácias sensibilizadas com o soro dos indivíduos positivos. Entretanto, apesar de ser considerada uma metodologia com elevada especificidade, a HAI apresenta resultados inconclusivos e possui baixa sensibilidade quando comparada ao ELISA (GADELHA et al., 2003).

O Western blot consiste na separação eletroforética de antígenos brutos ou purificados sobre um gel de poliacrilamida. Após a separação de acordo com seu peso molecular, ocorre a transferência dos antígenos para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF (fluoreto de polivinilidene). A verificação de bandas específicas ocorre por meio de uma reação imunoenzimática. Embora esta metodologia seja empregada para confirmação da presença de anticorpos contra vírus comumente triados em bancos de sangue (HIV, HTLV e HCV), alguns inconvenientes já foram relatados na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*, particularmente devido ao grande número de bandas presentes em extratos brutos (de 15 a 20 bandas, com pesos moleculares variando de 10 a 300 kDa). Além disso, demonstrou-se por eletroforese bidimensional a presença de diferentes proteínas com o mesmo peso molecular, mas diferentes pontos isoelétricos (LANAR; MANNING, 1984), além de revelarem anticorpos com reatividade cruzada após eluição (ROSFJORD et al., 1990), especialmente aqueles dirigidos contra antígenos entre 35 a 65 kDa, os mesmos presentes em soros de pacientes com leishmaniose (MALCHIODI et al., 1994; REED; BADARO; LLOYD, 1987). Por apresentar sensibilidade variando de 44,3% a 100% (NAKAZAWA et al., 2001; PERALTA et al., 1994; REICHE et al., 1998; ZARATE-BLADES et al., 2007), uma solução proposta foi o desenvolvimento de antígenos purificados, sejam eles naturais (NAKAZAWA et al., 2001; UMEZAWA et al., 1996), recombinantes (COSTA et al., 1997), ou peptídeos sintéticos

---

dispostos isolada ou combinadamente sobre linhas únicas ou múltiplas (OELEMANN et al., 1999; SABINO et al., 1997). A fração antigênica de 150-160 kDa purificada de tripomastigotas cultivados em células LLC-MK2 em meio RPMI 1640 forma a base do teste TESA-blot (*Trypomastigote excreted-secreted antigens*) (KESPER et al., 2000; SILVEIRA-LACERDA et al., 2004; UMEZAWA et al., 1996) e tem sido utilizada até hoje.

A metodologia de RIPA baseia-se no cultivo de epimastigotas na presença de um radioisótopo ( $^{125}\text{I}$  ou  $^{35}\text{S}$ ) que se incorpora ao parasita. Após a lise do agente, o meio é colocado em contato com o soro a ser estudo, levando a formação de imunocomplexos. A reatividade é evidenciada principalmente pela presença de suas glicoproteínas gp72 e gp90 (KIRCHHOFF et al., 1987). A manipulação de material radioativo constitui um fator limitante para a sua utilização. A quimioluminescência, por sua vez, consiste na detecção de anticorpos anti-Gal reativos contra glicoconjugados específicos de tripomastigotas e epimastigotas tratados com fosfolipases e purificados sob a forma de oligossacarídeos (ALMEIDA et al., 1994). Estes anticorpos só foram demonstrados em indivíduos cronicamente infectados, diferindo dos anticorpos anti-Gal isolados de indivíduos saudáveis. Esta é uma metodologia altamente sensível e específica, tendo sido relatada a capacidade de eliminar resultados inconclusivos ou falso-positivos, daí sua utilização na triagem de doadores de sangue (IZQUIERDO et al., 2013; MURCIA et al., 2013; PRAAST et al., 2011). Entretanto, em virtude de altos custos, torna-se inacessível a pequenos e médios centros urbanos.

A imunocromatografia consiste em uma matriz constituída de membrana de nitrocelulose ou de náilon tendo o antígeno do *T. cruzi* fixado em sua superfície na forma de linha. A reatividade é revelada pelo depósito de corante coloidal na linha de captura. Esta metodologia tem a vantagem de apresentar dispositivos para uso individual, rápido processamento, necessidade de pequeno volume de amostra, armazenamento a temperatura ambiente, não havendo exigência de reagentes, equipamentos e de competência técnica especializada para a sua execução (MÉDICOS SEM FRONTEIRA, 2008). Os testes rápidos apresentam sensibilidade de 93,4% a 100% e especificidade de 94,8 a 99,9% (CHAPPUIS et al., 2010; CHIPPAUX et al., 2009; LUQUETTI et al., 2003; PONCE et al., 2005; RODDY et al., 2008), sendo esta variação decorrente de fatores que afetam o seu desempenho, tais como o tipo e a origem das amostras analisadas (LUQUETTI et al., 2003; VERANI et al., 2009), idade e gravidez (CHIPPAUX et al., 2009; SOSA-ESTANI et al., 2008).

---

A aglutinação de partículas de látex já foi descrita na literatura para o sorodiagnóstico da doença de Chagas e apresenta vantagens de ser uma metodologia rápida, simples e a visualização de seus resultados serem dependentes ou não de equipamentos (ALVIAREZ et al., 2014; GARCIA et al., 2013, 2014). O látex, um polímero colóide, é utilizado nos ensaios de acoplamento das proteínas à sua superfície, podendo ser realizado por métodos físicos ou químicos, sendo os últimos os mais comumente utilizados nas reações imunológicas por permitirem maior estabilidade de acoplamento e que a proteína permaneça em sua conformação nativa (GARCIA et al., 2013). O princípio do método baseia-se na interação antígeno-anticorpo quando partículas de látex sensibilizadas são incubadas com o soro de interesse, ocorrendo aglutinação do material, podendo ser visível sem auxílio de equipamentos. Esta metodologia não é muito utilizada para o diagnóstico da doença de Chagas, pois a padronização pode ser comprometida em virtude da dissociação das partículas de látex sensibilizadas com as proteínas do *T. cruzi* (GARCIA et al., 2014).

O diagnóstico sorológico da doença de Chagas utilizando citometria de fluxo tem mostrado resultados promissores, permitindo diferenciar indivíduos acometidos por leishmaniose visceral, cutânea e doença de Chagas por meio de marcação diferencial (TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2015). Entretanto, não é reconhecida como teste diagnóstico, sendo disponível apenas para pesquisa.

Os ensaios de microarranjo líquido, descritos inicialmente em 1977 (HORAN; WHEELLESS, 1977), permitem análises quantitativas e qualitativas de múltiplos alvos em uma única reação e vem conquistando popularidade na área de imunodiagnóstico e pesquisa básica (MILLER; TANG, 2009). Atualmente, há produtos comerciais desenvolvidos com base neste princípio. O sistema Luminex (Austin, TX, EUA), por exemplo, consiste em um conjunto de microesferas de polietileno em suspensão, impregnadas com diferentes quantidades de dois fluoróforos, gerando, desta forma, esferas com marcações diferenciais baseadas em código de cores, as quais são identificadas pelo equipamento. Diferentes antígenos podem ser imobilizados a microesferas específicas através de ligações covalentes não reversíveis. Anticorpos presentes no soro de indivíduos infectados se ligam aos antígenos localizados na superfície das microesferas e a detecção é realizada por meio de um terceiro marcador fluorescente, a ficoeritrina ligada ao anticorpo de detecção (MILLER; TANG, 2009). Por meio de um sistema de microfluídica o equipamento utiliza *lasers* para identificação das esferas e quantificação dos anticorpos ligados aos antígenos, de acordo com a intensidade de sinal associado a cada microesfera (DUNBAR; JACOBSON, 2000; SPIRO; LOWE;

---

BROWN, 2000). A estratégia de diferenciação permite a detecção simultânea de múltiplas amostras com alta velocidade de processamento, podendo na teoria analisar mais de 500 reações diferentes na mesma solução e em pouco tempo. O microarranjo líquido foi utilizado em ensaios contendo uma única proteína do *T. cruzi* ou em ensaios multiteste, sendo verificado aumento dos parâmetros de desempenho em ambas as situações quando comparados à utilização do lisado do parasita (FOTI et al., 2009). No entanto, é uma metodologia cara e depende de pessoal especializado para a sua realização.

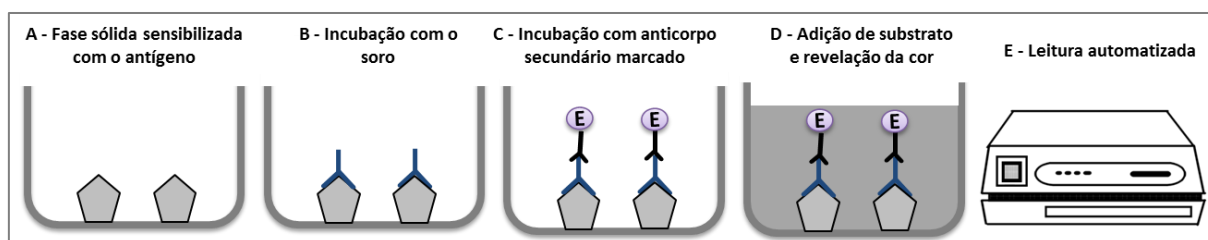
A PCR, embora delineada para ser a metodologia com maior sensibilidade e especificidade para triagem de doares de sangue (LELIE et al., 2002) e sugerida como método confirmatório para infecção pelo *T. cruzi* (AVILA et al., 1991, 1993; BRITTO, 2009; GOMES et al., 1999; WINCKER et al., 1994), não apresentou interesse na hemoterapia até o momento, seja pela necessidade de utilização de agentes caotrópicos para melhor extração do DNA do parasita (AVILA et al., 1991), assim como sensibilidade variável obtida de amostras provenientes de indivíduos reconhecidamente infectados (BRASIL et al., 2010; BRENIÈRE et al., 1992; BRITTO, 1995, 2009; SILBER et al., 1997; VERA-CRUZ et al., 2003; ZINGALES et al., 1998). Até o momento não foi encontrado um alvo consensual para diagnóstico da doença de Chagas por meio da PCR. Por este motivo, o Ministério da Saúde do Brasil não reconhece a sua utilização como teste diagnóstico para a doença de Chagas (BRASIL, 2005).

Dentre as metodologias apresentadas, o teste de ELISA constitui o teste de escolha em virtude de sua facilidade de execução, baixo custo, possibilidade de automação e testagem de vários indivíduos ao mesmo tempo, permitindo realizar determinações quantitativas diretas da interação antígeno-anticorpo por medida da atividade enzimática sobre um substrato (DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001; GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). Após sensibilização da fase sólida com antígenos específicos, o material é incubado com soro de interesse e, em seguida, com anticorpo secundário anti-imunoglobulina humana marcado com uma enzima. Posteriormente adiciona-se o substrato e observa desenvolvimento de cor. Por fim, a leitura é realizada em comprimento de onda definido (Figura 9).

Em 1975, foi descrita a padronização e utilização de um teste de imunoperoxidase para o diagnóstico da doença de Chagas, utilizando como antígeno epimastigotas de *T. cruzi* formalizadas e fixadas em lâminas de microscopia. Na ocasião, o teste apresentou desempenho similar à IFI e chamou atenção pela redução do custo, pois a coloração resultante podia ser visualizada utilizando microscopia óptica (FERREIRA; CAMARGO;

NAKAHARA, 1975). Neste mesmo ano, o teste de ELISA foi padronizado em placas de microtitulação com componentes antigênicos solúveis de *T. cruzi* previamente adsorvidos (VOLLER et al., 1975), proporcionando novas perspectivas na sorologia da doença. Atualmente existe a possibilidade de utilizar frações antigênicas definidas obtidas por processos físicos e químicos ou através de técnicas de biologia molecular e clonagem.

**Figura 9** - Esquema do teste de ELISA



**Fonte:** O autor.

**Nota:** A reação começa com a sensibilização da fase sólida com antígenos específicos (A), seguida por incubação com o soro de interesse (B). Posteriormente é realizada incubação com anticorpo secundário anti-imunoglobulina humana marcado com enzima (C) e a reação é revelada com adição do substrato (D). Por fim, a intensidade de cor é determinada em comprimento de onda específico em um leitor de microplacas (E).

Tradicionalmente os testes de ELISA convencionais utilizam extratos brutos ou antígenos semipurificados de cepas de *T. cruzi* que, em virtude de sua complexidade antigênica, resultam em problemas de padronização, baixa confiabilidade e possibilidade de reatividade cruzada com outros microrganismos, principalmente com espécies do gênero *Leishmania* e *T. rangeli* (ARAUJO, 1986; PAN et al., 1992; SANTOS et al., 2012). Um estudo multicêntrico realizado em 1997 demonstrou que a deficiência de padronização dos reagentes foi a responsável pela incongruência dos resultados quando o mesmo painel sérico foi usado para avaliação de diversos kits (SAEZ-ALQUEZAR, 2007). Além disso, estes testes nem sempre são capazes de detectar a infecção em indivíduos com baixos níveis de imunoglobulinas (FURUCHÓ et al., 2008; SANTOS et al., 2012). Tais deficiências podem ser corrigidas com a utilização de antígenos específicos identificados e purificados através de técnicas de biotecnologia.

No início dos anos 1980, o uso combinado das técnicas de imun química e clonagem gênica permitiram a identificação de novos antígenos. Esta estratégia criou protocolos rápidos e eficientes que possibilitaram a identificação de uma grande quantidade de antígenos em curto espaço de tempo (BAYER-SANTOS et al., 2013; BAYONA et al., 2011; PABA et al., 2004; PARODI-TALICE et al., 2004; WEN et al., 2012). Assim, antígenos recombinantes

---

foram sintetizados e avaliados quanto a sua estrutura por cristalografia de raios X (MARTINEZ et al., 2014; MURAKAMI et al., 2013; PIZARRO et al., 2011), em ensaios de vacinação (GUPTA et al., 2013; KNIGHT et al., 2014; NAKAYASU et al., 2012; PEREIRA et al., 2005) e em testes diagnósticos, capturando anticorpos específicos e evitando potenciais interferências de outros componentes que normalmente ocorrem quando a matriz antigênica é obtida por purificação de proteínas de origem nativa (BRENIÈRE et al., 1997; CAMUSSONE et al., 2009; COTRIM et al., 1990; DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001; FOTI et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2010; HOUGHTON et al., 1999; UMEZAWA et al., 1999; VERISSIMO DA COSTA et al., 2013). Desta maneira, o uso das proteínas recombinantes aumentou a especificidade da reação imunológica, levando a um diagnóstico mais preciso (AGUIRRE et al., 2006; CAMUSSONE et al., 2009).

Nesta metodologia, as proteínas são geralmente preparadas através da expressão heteróloga, principalmente em *Escherichia coli* (CHEN, 2012; WAEGEMAN; SOETAERT, 2011). A sequência nucleotídica de interesse é inserida em um plasmídeo bacteriano, sendo este último usado para transformar bactérias competentes. As proteínas codificadas pelo plasmídeo são expressas em cultura bacteriana e, posteriormente, purificadas, gerando produtos com elevado grau de pureza (YOUNG; BRITTON; ROBINSON, 2012). A vantagem de utilizar proteínas recombinantes é a possibilidade de se trabalhar com antígenos inteiramente caracterizados, os quais podem ser avaliados individualmente para a determinação de anticorpos em diferentes condições clínicas. Além disso, sua produção e avaliação tornaram-se padronizadas, prerrogativa indispensável para que um teste diagnóstico possua reprodutibilidade aceitável, ou seja, com coeficiente de variação inferior a 20% (JACOBSON, 1998; SAEZ-ALQUEZAR, 2007). Outras vantagens podem ser mencionadas, como manipulação de agentes não infecciosos, não havendo necessidade de cultivos de *T. cruzi* e a redução de custos, visto que as células bacterianas, uma vez transformadas, podem produzir grande quantidade de proteínas recombinantes por muitos anos (CHEN, 2012; WAEGEMAN; SOETAERT, 2011). Sem mencionar que os plasmídeos contendo o inserto ligado, denominados constructos, são estáveis por longo período de tempo.

Desta maneira, clones de expressão para diferentes proteínas do *T. cruzi* foram criados e uma grande quantidade de peptídeos recombinantes foi utilizada para o diagnóstico sorológico, alguns dos quais possuindo em sua constituição blocos de aminoácidos conservados e dispostos em *tandem* que se repetem várias vezes aumentando, portanto, o seu reconhecimento pelo soro de indivíduos portadores da doença de Chagas (DA SILVEIRA;

---

UMEZAWA; LUQUETTI, 2001; HOFT et al., 1989; LAFAILLE et al., 1989; THUY et al., 2012; VALIENTE-GABIOUD et al., 2011). No entanto, um estudo multicêntrico conduzido em 1997 demonstrou que alguns antígenos não-repetitivos apresentam parâmetros de desempenho semelhantes àqueles obtidos com a utilização de antígenos com repetição (UMEZAWA et al., 1999).

O sequenciamento do genoma do *T. cruzi* (EL-SAYED et al., 2005) e ferramentas de bioinformática possibilitaram a descrição de novos antígenos a partir da predição de proteínas putativas e de análise de antigenicidade (COOLEY et al., 2008; GOTO; CARTER; REED, 2008; HERNÁNDEZ et al., 2010). Assim, foi possível escolher os antígenos que apresentam baixo grau de homologia com proteínas de organismos relacionados ao *T. cruzi*. Este fato diminuiu sobremaneira a quantidade de reações cruzadas, visto que as proteínas recombinantes foram sintetizadas a partir de sequências de DNA nas quais as regiões responsáveis por estas reações pudessem ser removidas (AGUIRRE et al., 2006; DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001; GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009; HERNÁNDEZ et al., 2010; THOMAS et al., 2001; VERISSIMO DA COSTA et al., 2013).

Os Quadros 1, 2 e 3 apresentam as principais proteínas recombinantes descritas na literatura e avaliadas para potencial uso em diagnóstico, monitoramento de cura e/ou verificação do estágio da doença cardíaca. Embora muitas delas possuam sequências similares ou idênticas, por razões históricas receberam diferentes nomenclaturas. Por este motivo, as proteínas similares ou idênticas aparecem agrupadas. O Quadro 1 agrupa as proteínas que possuem regiões repetitivas em sua sequência. O Quadro 2 reúne as proteínas pertencentes à família das trans-sialidases e trans-sialidases-símile. Já o Quadro 3 descreve as demais proteínas que não se encaixam nas classificações dos Quadros 1 e 2.



**Quadro 1** - Antígenos recombinantes que apresentam sequências repetitivas

| Antígenos                           | REP (aa) | Proteína nativa (kDa)                   | Características                               | Utilização | Referências* |
|-------------------------------------|----------|---|---|------------|--------------|
| CRA<br>Ag30<br>JL8<br>TCR27<br>RP4  | 14       | 225<br>180-225<br>>170<br>150-200<br>NR | Localização<br>citoplasmática                 | IC         | Grupo A      |
| FRA<br>Ag1<br>JL7<br>H49<br>RP1     | 68       | >300<br>205<br>>170<br>>300<br>NR       | Proteínas associadas ao<br>citoesqueleto      | IC         | Grupo B      |
| B13<br>Ag2<br>TCR39<br>PEP-2<br>RP5 | 12       | 116-140<br>85<br>82<br>22<br>NR         | Proteínas de superfície<br>de tripomastigotas | IC<br>EDC  | Grupo C      |
| Ag36<br>JL9<br>MAP<br>RP3           | 38       | 85<br>110<br>110<br>NR                  | Proteínas associadas à<br>microtúbulos        | IA<br>IC   | Grupo D      |
| TcE                                 | 7        | 35                                      | Proteína ribossomal                           | IC         | Grupo E      |
| B12                                 | 20       | 200-230                                 | NR  | IC         | Grupo F      |

**Fonte:** O autor.

**\*Nota:** GRUPO A: Camussone et al. (2009); Hoft et al. (1989); Ibañez et al. (1988); Lafaille et al. (1989); Levin et al. (1989). Grupo B: Camussone et al. (2009); Cotrim et al. (1995); Ibañez et al. (1988); Lafaille et al. (1989); Levin et al. (1989). Grupo C: Camussone et al. (2009); Gruber ; Zingales (1993); Hoft et al. (1989); Ibañez et al., 1988; Peralta et al. (1994); Vicco et al. (2013). Grupo D: Camussone et al. (2009); Ibañez et al. (1988); Kerner et al., (1991); Levin et al. (1989). Grupo E: Houghton et al. (1999). Grupo F: Gruber; Zingales (1993).

**Legenda:** aa (aminoácidos); Ag (*antigen*); CRA (*cytoplasmic repetitive antigen*); EDC (estágio de doença cardíaca); FRA (*flagelar repetitive antigen*); IA (infecção aguda); IC (infecção crônica); MAP (*microtubule associated protein*); NR (não reportado); PEP (*peptide with repeating epitopes*); REP (Repetições); RP (*repetitive peptide*); Tc (*Trypanosoma cruzi*); TCR (*Trypanosoma cruzi repetitive*).

**Quadro 2** - Antígenos recombinantes pertencentes à família das trans-sialidasas e TS-símile que apresentam sequências repetitivas

| Antígenos                 | REP (aa) | Proteína nativa (kDa) | Características                                     | Utilização           | Referências* |
|---------------------------|----------|-----------------------|---|----------------------|--------------|
| SAPA<br>TCNA<br>TS<br>RP2 | 12       | 105-205               | Família das TS                                      | IA<br>ICON<br>ICLeis | Grupo A      |
| TcL01.2                   | NR       | NR                    | Família das TS                                      | IC                   | Grupo B      |
| Ag13<br>TcD               | 5        | 85<br>260             | Família das TS                                      | IA<br>IC             | Grupo C      |
| Rc TS                     | NR       | NR                    | Família das TS                                      | CIC                  | Grupo D      |
| FL-160<br>CEA<br>CRP160   | NR       | 160                   | Proteína associada<br>ao flagelo da<br>TS-símile    | IC<br>MC             | Grupo E      |
| TSSAI                     | NR       | NR                    | Mucina de<br>tripomastigota da<br>família TS-símile | TTc                  | Grupo F      |
| TSSAII                    | NR       | NR                    | Mucina de<br>tripomastigota da<br>família TS-símile | TTc<br>DCLeis        | Grupo G      |

**Fonte:** O autor.

**\*Nota:** Grupo A: Brenière et al. (1997); Camussone et al. (2009); Frasch et al. (1991); Frasch; Reyes (1990); Gil et al. (2011); Russomando et al. (2010). Grupo B: Houghton et al. (1999). Grupo C: Burns et al. (1992). Grupo D: Buchovsky et al. (2001). Grupo E: Cetron et al. (1992); Jazin et al. (1995); Meira et al. (2004); Norris et al. (1997). Grupo F : Di Noia et al. (2002). Grupo G: Cimino et al. (2011); Di Noia et al. (2002); Bhattacharyya et al. (2010).

**Legenda:** aa (aminoácidos); CEA (exoantígeno crônico); CIC (confirmação da infecção crônica); CRP (proteína regulatória complementar); DCLeis (diagnóstico confirmatório em áreas endêmicas para leishmaniose); FL (proteína de superfície flagelar); IA (infecção aguda); ICLeis (infecção crônica em áreas endêmicas para leishmaniose); ICON (infecção congênita); MC (monitoramento de cura); NR (não reportado); Rc TS (região catalítica da TS); REP (Repetições); RP (peptídeo repetitivo); RP TSSA (pequena superfície recombinante de tripomastigota); SAPA (antígeno de fase aguda); Tc (*Trypanosoma cruzi*); TS (trans-sialidasas); TTc (tipagem do *T. cruzi*).

**Quadro 3** - Outros antígenos recombinantes propostos para uso diagnóstico

| Antígenos  | Proteína nativa (kDa) | Características   | Utilização     | Referências* |
|--|-----------------------|---|----------------|--------------|
| R13<br>P2β   | NR                    | Proteína ribossomal   | EDC            | Grupo A      |
| FcaBP<br>1F8<br>Tc-24<br>F29<br>Tc-28<br>Tc-29<br>Calflagina | 24-28                 | Proteína flagelar dependente de cálcio                      | IA<br>IC<br>MC | Grupo B      |
| cy-hsp70<br>mt-hsp70<br>grp-hsp78                            | 70-78                 | Proteínas de choque térmico                                 | IC<br>MC       | Grupo C      |
| JL5  | 38                    | Proteína ribossomal P                                       | EDC            | Grupo D      |
| A13  | 230                   | NR  | IA<br>IC       | Grupo E      |
| SA85-1.1   | 85                    | Proteína da superfície de tripomastigota                    | IC             | Grupo F      |
| TcAg29   | NR                    | Proteína reguladora de alginato                             | IC             | Grupo G      |
| TcAg4  | NR                    | Proteína ligadora de RNA                                    | IC             | Grupo H      |
| Tc1, Tc3,<br>Tc4, Tc9, Tc10,<br>Tc12, Tc15                   | NR                    | Proteínas repetitivas obtidas por análise de bioinformática | IC             | Grupo I      |
| Tc40   | 38-100                | NR  | IC             | Grupo J      |
| Ubiquitina   | NR                    | NR  | IC             | Grupo K      |

**Fonte:** O autor.

**\*Nota:** Grupo A: Aznar et al. (1995); Brenière et al. (2002); Diez et al. (2006); Fabbro et al. (2011); Vicco et al. (2013). Grupo B: Abate et al. (1993); Engman et al. (1989); Fabbro et al. (2007); Frasch et al. (1991); Gonzalez et al. (1985); Krautz et al. (1995); Marcipar et al. (2005). Grupo C: Frasch et al. (1991); Krautz et al. (1998). Grupo D: Frasch et al. (1991). Grupo E: Frasch et al. (1991). Grupo F: Cetron et al. (1992). Grupo G: DaRocha et al. (2002). Grupo H: DaRocha et al. (2002); Goto et al. (2008). Grupo I: Goto et al. (2008); Grupo J: Lesénéchal et al. (1997); Grupo K: Télles et al. (1999).

**Legenda:** cy-hsp (proteína de choque térmico citoplasmática); EDC (estágio de doença cardíaca); FcaBP (proteína flagelar ligadora de cálcio); grp-hsp (proteína de choque térmico do retículo endoplasmático); IA (infecção aguda); IC (infecção crônica); MC (monitoramento de cura); mt-hsp (proteína de choque térmico mitocondrial); NR (não reportado); Tc (*Trypanosoma cruzi*).

---

Todavia, a despeito dos avanços alcançados, resultados falso-negativos continuaram a ser evidenciados, indicando que a utilização de um único antígeno recombinante não seria capaz de diagnosticar todos os indivíduos portadores da doença de Chagas (FRASCH et al., 1991; LEVIN et al., 1991; MONCAYO; LUQUETTI, 1990; PERALTA et al., 1994). Tal limitação deve-se a própria natureza do antígeno recombinante, ou seja, a monotomia de epítomos presentes em um único antígeno isolado. Apesar de muitos deles serem constituídos por sequências repetitivas, nem sempre são identificados por anticorpos específicos presentes nos indivíduos positivos. Este fato deve-se ao elevado grau de polimorfismo intraespecífico observado para o *T. cruzi*, sugerindo que antígenos que apresentam valores máximos de sensibilidade e especificidade em dada localidade podem não assegurar bom desempenho em outras regiões geográficas (AZUAJE; RAMIREZ; DA SILVEIR, 2007; BALOUZ et al., 2015; GUZMÁN-GÓMEZ et al., 2015; MARTIN et al., 2014). O genoma do *T. cruzi* é o mais complexo dentre os tripanossomatídeos que infectam o homem, com tamanho de 110 milhões de pares de bases. Aproximadamente 18% dos 12.000 genes codificadores de proteínas descritos até o momento são responsáveis por sintetizar proteínas de superfície envolvidas na interação parasita/hospedeiro (EL-SAYED et al., 2005). É interessante notar que, em virtude dessa complexidade genética e antigênica, 50% dos genes do parasita codificam proteínas hipotéticas, ou seja, que não apresentam similaridade com proteínas descritas em outros organismos (MARTINS et al., 2011). Por conta deste polimorfismo, o parasita é agrupado em sete linhagens distintas denominadas unidades de tipagem discretas (DTU – *Discrete Typing Units*), a saber: TcI a TcVI e Tcbat (ZINGALES et al., 2009, 2012), as quais, por sua vez, são subdivididas em cepas caracterizadas por marcadores moleculares específicos. Assim, as cepas pertencentes a cada DTU devem ser consideradas como famílias de clones estritamente relacionadas, mas não como um único clone. Por este motivo foi criado o termo *clonet* para se referir ao conjunto de características presentes dentro de cada subgrupo de cepas (TIBAYRENC; AYALA, 1991). O ancestral comum mais recente de um determinado *clonet* pode ter centenas de anos ou apenas uma semana, podendo ser de grande relevância clínica, epidemiológica e diagnóstica. Além disso, muitas proteínas do parasita são submetidas a modificações pós-traducionais gerando variantes de uma mesma proteína. Tais modificações podem ser ocasionadas pela introdução de resíduos de açúcar (MUIÁ et al., 2010), ácidos graxos, grupos isoprenílicos, âncoras de GPI às proteínas recém-sintetizadas, contribuindo para o elevado grau de diversidade antigênica do *T. cruzi* (CORDERO et al., 2009; EMMER

et al., 2009; MUIÁ et al., 2010). Tamanha variabilidade antigênica representa um fator limitante no desempenho dos testes diagnósticos utilizados nos laboratórios clínicos.

Uma alternativa para contornar esta limitação foi a combinação de dois ou mais antígenos recombinantes em um único teste, verificando um aumento significativo da sensibilidade sem perda de especificidade (FRASCH et al., 1991). Um estudo realizado em 1999 avaliou os parâmetros de desempenho de seis proteínas recombinantes isoladas utilizando um painel sorológico de amostras provenientes de diferentes países (UMEZAWA et al., 1999). Posteriormente estas mesmas proteínas foram avaliadas em diferentes misturas, demonstrando haver melhora nos parâmetros de desempenho e obtenção de valores mais elevados de densidade óptica (DO) (UMEZAWA et al., 2003). Além do mais, amostras séricas que apresentavam baixos valores de DO quando as proteínas recombinantes eram utilizadas isoladamente, passaram a apresentar sinal maior quando as misturas foram usadas (UMEZAWA et al., 2004). Desde então combinações de diferentes antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos foram testadas utilizando-se diferentes formatos e plataformas (CABALLERO et al., 2007; CAMUSSONE et al., 2009; GADELHA et al., 2003; KRIEGER et al., 1990; PIRARD et al., 2005; REMESAR et al., 2009). Em geral, as misturas apresentam alta sensibilidade e especificidade confirmando o potencial dos antígenos de *T. cruzi* de segunda e terceira gerações no sorodiagnóstico da doença de Chagas. Evidentemente, várias destas combinações deverão ser avaliadas com um número maior de soros, inclusive de diferentes regiões geográficas, para confirmar seu valor diagnóstico. Apesar do alto desempenho dos testes diagnósticos utilizando uma mistura de antígenos recombinantes, resultados diferentes de sensibilidade e especificidade ainda foram obtidos dada a heterogeneidade antigênica das diversas cepas de *T. cruzi*. Além disso, a padronização desta estratégia é crítica em virtude das características individuais de cada uma das proteínas em relação às etapas de purificação e do balanceamento do número de epítomos disponíveis em fase sólida após imobilização nas placas de microtitulação (ANANDARAO et al., 2005; DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001; DIPTI; JAIN; NAVIN, 2006).

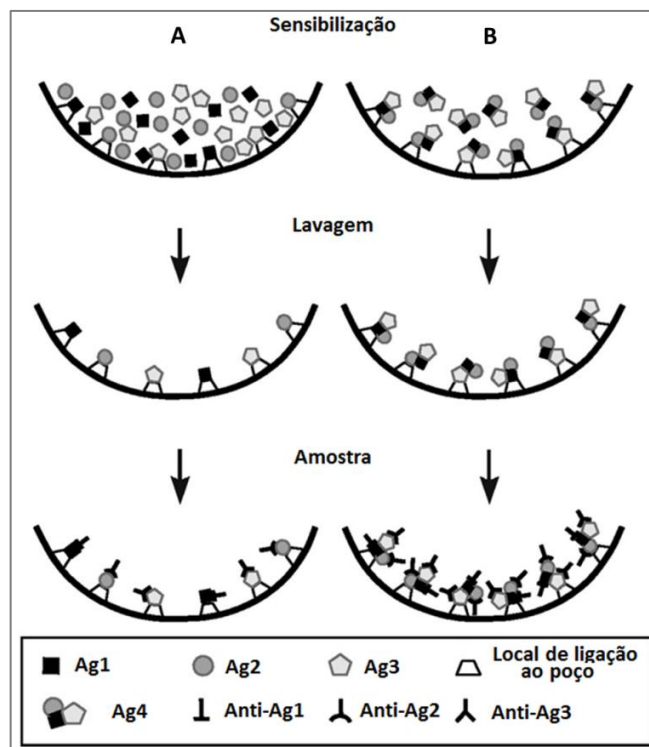
Uma das estratégias propostas para diminuir esta heterogeneidade, reduzindo também a possibilidade de reações cruzadas, é a utilização de moléculas sintéticas formadas por epítomos conservados e repetitivos de diferentes proteínas em uma única molécula recombinante gerando um poliantígeno, quimera ou antígeno multi-epítomo (AGUIRRE et al., 2006; CAMUSSONE et al., 2009; HOUGHTON et al., 1999). Foi verificado que peptídeos sintéticos contendo repetições quando testados isoladamente apresentam desempenho inferior

---

ao do antígeno recombinante correspondente. A fusão dos antígenos CRA (*cytoplasmic repetitive antigen*) e FRA (*flagelar repetitive antigen*), por exemplo, elevou para 100% os valores de sensibilidade e especificidade em uma pequena amostra estudada (ALMEIDA et al., 1990), bem como a utilização do poliantígeno CA-2-CRA-TcD-TcE, resultando em valores acima de 99% para ambos os parâmetros (HERNÁNDEZ et al., 2010). Foi também verificado que a utilização de proteínas quiméricas é capaz de aumentar a reatividade de amostras que possuem baixo sinal, bem como tinha sido relatado no caso das misturas de proteínas recombinantes (CAMUSSONE et al., 2009). Uma vantagem adicional na utilização desta abordagem refere-se à sensibilização da fase sólida, pois, quando ocorre a partir de misturas de diferentes proteínas recombinantes, há diminuição da antigenicidade individual devido ao bloqueio de cadeias essenciais (HERNÁNDEZ et al., 2000a, 2000b; HERNÁNDEZ MARIN et al., 2001a, 2001b; SHAH et al., 1996). Além disso, as proteínas individuais presentes nas misturas podem competir umas com as outras pelos sítios de ligação, levando a uma diminuição da sensibilidade. Desta maneira, a sensibilização da fase sólida utilizando mistura de proteína é dita heterogênea (KENNY; DUNSMOOR, 1983). Por outro lado, quando as proteínas quiméricas são adsorvidas na fase sólida somente uma pequena porção das moléculas fica comprometida com a ligação à microplaca, deixando o restante dos epítomos disponíveis para reagir livremente com anticorpos específicos, sem restrições estereoquímicas. Como as interações com a fase sólida ocorrem de maneiras variadas o cenário resultante consiste em uma sensibilização homogênea e reprodutível, como mostrado na Figura 10. Consequentemente, as proteínas quiméricas podem fornecer uma maior proporção de sítios ativos livres, aumentando a sensibilidade do teste (BELLUZO et al., 2011; CAMUSSONE et al., 2009; GONZALEZ et al., 2010). A importância desta característica torna-se mais evidente quando a avaliação do potencial diagnóstico de uma quimera é realizada utilizando amostra sérica de indivíduos infectados provenientes de diferentes regiões geográficas.

A tecnologia do DNA recombinante é largamente utilizada para geração de moléculas híbridas e obtenção de antígenos para a preparação de vacinas, mas, até o momento, poucos trabalhos relatam a sua utilização no incremento do diagnóstico da doença de Chagas. Neste sentido, uma avaliação sistemática destas proteínas pode permitir a seleção e/ou o desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico com melhores desempenhos. Além disso, modificações na sequência linear das quimeras podem ser realizadas com o objetivo de obter um produto com elevado desempenho diagnóstico.

**Figura 10** - Ilustração da sensibilização de microplacas de titulação seguida pela reação antígeno-anticorpo



**Fonte:** Modificada de Camussone et al. (2009).

**Nota:** (A) Mistura de proteínas recombinantes; (B) Proteína quimérica Ag4 composta por estruturas presentes nos Ag1, Ag2 e Ag3.

**Legenda:** Ag (antígeno).

## 2.7 Estudos de validação de testes diagnósticos

A avaliação adequada de biomarcadores, utilizados no diagnóstico laboratorial, clínico, monitoramento de evolução clínica e critério de cura, é realizada por meio de parâmetros de desempenho determinados por cálculos estatísticos (KASSAI; MANIÈRE; NGUYEN, 2006a; OUCHCHANE; RABILLOUD; BOIRE, 2009). No caso específico de diagnóstico sorológico laboratorial, os parâmetros a ser determinados são aqueles relacionados ao sucesso do teste em identificar corretamente um determinado agravo em indivíduos que realmente o possuem, independentemente da presença ou ausência de sinais e sintomas. E, de modo semelhante, não identificá-lo no caso dos indivíduos que não o possuem. Desta maneira, o desenho de estudo deve responder as quatro perguntas abaixo, as quais compõem as quatro fases do delineamento de um estudo de validação de métodos (HOBBS, 2000; IRWIG et al., 2002; KASSAI; MANIÈRE; NGUYEN, 2006b; SACKETT; HAYNES, 2002):

- a) O teste é capaz de diferenciar indivíduos positivos de negativos?
- b) Teste com resultado positivo é mais frequente nos indivíduos portadores do agravo?
- c) Qual a precisão do teste em identificar na população os indivíduos com suspeita de serem portadores do agravo?
- d) O teste oferece algum benefício na melhora do estado de saúde dos indivíduos portadores da doença?

A fase I é dita exploratória e seu objetivo primordial é verificar se o teste é capaz de diferenciar os indivíduos portadores de um agravo daqueles que não o possuem. A realização de um estudo piloto (ou prova de conceito) com pequeno número amostral é suficiente para responder esta questão. Este tipo de estudo é barato, rápido e um resultado negativo evita que as fases posteriores sejam realizadas, as quais requerem maior investimento financeiro e de tempo. As amostras utilizadas no estudo piloto devem ser sorologicamente caracterizadas, contendo amostras negativas de indivíduos provenientes de áreas endêmicas e não endêmicas e amostras positivas representativas do agravo, ou seja, de indivíduos assintomáticos e sintomáticos com os sintomas os mais variados possíveis, bem como de diferentes graus de evolução clínica da doença. Amostras de indivíduos com suspeita de serem portadores do agravo jamais devem ser incluídos nesta fase. Na fase I também podem ser realizadas avaliações do teste ao submetê-lo a diferentes condições de temperatura e humidade, verificação de sua eficiência ao longo do tempo (validade) e avaliação da reprodutibilidade (intrateste, interteste, interlote, interlaboratorial, interoperador, etc) (VRAY, 2015). Assim, a fase I permite saber se o teste é suficientemente confiável para se iniciar a fase II do estudo.

A fase II tem por objetivo avaliar se o teste tem maior probabilidade em fornecer resultados positivos nos indivíduos portadores do agravo que nos não portadores, e vice-versa, ou seja, maior probabilidade em fornecer resultados negativos nos indivíduos não portadores do agravo quando comparado aos portadores. Esta fase é realizada através de um estudo de caso-controle, no qual os protocolos utilizados devem ser bem definidos, com critérios de inclusão e exclusão de amostras/indivíduos delineados, controlando, desta maneira, variações e distorções (vieses) de seleção (WHITING et al., 2004, 2013). O número de amostras deve ser determinado através de estimadores estatísticos, não deixando de levar em consideração os parâmetros de desempenho requeridos para o teste. Semelhantemente ao estudo de fase I, as amostras positivas devem ser representativas do agravo e as negativas selecionadas a partir de indivíduos residentes em áreas endêmicas e não endêmicas. Amostras provenientes de indivíduos suspeitos de serem portadores do agravo ainda não devem compor a amostragem



---

utilizada (SACKETT; HAYNES, 2002). Para os testes quantitativos, a definição do ponto de corte é imprescindível, podendo ser realizado através da construção de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic* ou Característica de Operação do Receptor, em português) ou através da diferença de média e desvio padrão entre os resultados obtidos de amostras negativas e positivas (VRAY, 2015). Os estudos de fase I e II são retrospectivos realizados unicamente com a finalidade de pesquisa, os quais utilizam amostras previamente classificadas através de testes de referência ou padrão-ouro.

O estudo de fase III tem como objetivo determinar o desempenho do teste utilizando amostras provenientes de indivíduos da população, com suspeita ou não de serem portadores do agravo. Trata-se de um estudo prospectivo, diferentemente das fases I e II. Neste caso, a condição sorológica dos indivíduos é desconhecida, pois não são usados previamente os testes de referência. Os parâmetros de desempenho obtidos podem ser comparados com aqueles obtidos a partir de testes comercialmente disponíveis (VRAY, 2015). Os estudos de fase III são mais onerosos que os anteriores. Além disso, caso a doença seja de baixa prevalência o número amostral pode tornar o estudo inviável. Entretanto, uma vantagem de sua utilização é a possibilidade da determinação de dois parâmetros de desempenho que até esta fase não podiam ser conhecidos: os valores preditivos positivo e negativo. Estes parâmetros devem ser determinados somente quando amostras com sorologia desconhecida são utilizadas, pois, caso contrário, os valores preditivos terão resultados distorcidos e conclusões errôneas sobre o desempenho dos testes (VRAY, 2015).

Por fim, segue-se o estudo de fase IV, cujo objetivo é mensurar o impacto da introdução do teste com base na melhora ou piora da morbimortalidade do agravo e do custo decorrente de sua introdução, permitindo avaliar se os indivíduos submetidos a este novo teste foram beneficiados de algum modo quando comparados àqueles que não foram submetidos. Árvores de decisão podem ser construídas utilizando o modelo de Markov como base (CHAN et al., 2011) e a análise de custo-eficácia pode ser determinada. No geral, são realizados ensaios randomizados para responder a esta questão (VRAY, 2015).

---

### 3 JUSTIFICATIVA

Atualmente os *kits* sorológicos para o diagnóstico laboratorial da infecção causada pelo *T. cruzi* utilizam em sua matriz extratos totais ou antígenos brutos dos parasitos, o que pode levar a resultados errôneos, uma vez que o parasito compartilha similaridade com outras espécies de tripanosomatídeos. Uma tentativa de resolver este problema é a utilização de peptídeos sintéticos específicos, aumentando a sensibilidade e especificidade diagnósticas. No entanto, apesar dos esforços, os antígenos utilizados nem sempre são capazes de reconhecer cepas de diferentes regiões geográficas, podendo ocorrer reações falso negativas. Portanto, a utilização de diferentes antígenos unidos entre si (poliantígenos), dispostos em uma matriz antigênica de um teste diagnóstico, pode aumentar a sensibilidade de modo a contemplar as cepas circulantes em diferentes áreas endêmicas no Brasil e fora dele, e que seja capaz de diferenciar o *T. cruzi* de espécies que compartilham similaridade antigênica.

Com base no exposto, fica evidente que a busca por novos antígenos poderá atender à necessidade de diagnósticos mais precisos e diferenciais, aliado a uma maior rapidez nos resultados, redução de custos e aumento da eficiência de processamento de grandes quantidades de testes. Este estudo, que está inserido na cadeia de desenvolvimento tecnológico de um reagente diagnóstico para a doença de Chagas, teve como proposta o desenvolvimento e retenção de tecnologia brasileira e a redução da dependência por produtos estrangeiros na área diagnóstica, podendo integrar a plataforma diagnóstica da doença de Chagas do Ministério da Saúde.

#### **4 HIPÓTESE**

A utilização de poliantígenos recombinantes produzidos a partir de regiões altamente antigênicas do *Trypanosoma cruzi* é mais eficaz para o diagnóstico da doença de Chagas crônica do que os antígenos utilizados nas metodologias atuais, aumentando a sensibilidade e especificidade do teste.

---

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Caracterizar e avaliar o desempenho dos poliantígenos recombinantes IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBPM-8.3 e IBPM-8.4 para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em indivíduos na forma crônica da doença de Chagas.

### 5.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer os testes de referência a ser adotados como padrão-ouro para confirmação do estado sorológico das amostras usadas neste estudo;
- b) Padronizar e otimizar os testes imunoenzimáticos no formato ELISA indireto utilizando os poliantígenos recombinantes IBMP-8.1, 8.2, 8.3 e 8.4 de *T. cruzi*;
- c) Caracterizar e avaliar as propriedades estruturais dos poliantígenos IBMP-8.1, 8.2, 8.3 e 8.4 quanto à sua estabilidade a diferentes condições desnaturantes;
- d) Validar os quatro ensaios imunoenzimáticos utilizando os poliantígenos IBMP-8.1, 8.2, 8.3 e 8.4 através de soros de indivíduos infectados e não infectados pelo *T. cruzi* de distintas regiões geográficas do país e da América Latina;
- e) Avaliar a reatividade cruzada dos poliantígenos IBMP-8.1, 8.2, 8.3 e 8.4 frente a amostras séricas de indivíduos portadores de diferentes doenças infecto-parasitárias.

---

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo de validação de métodos, o qual refere-se ao processo que determina o desempenho de um ensaio que foi desenvolvido, otimizado e padronizado para uma determinada finalidade (JACOBSON, 1998). Este tipo de estudo estabelece parâmetros de desempenho, fornecendo informações úteis sobre a capacidade do ensaio, em termos quantitativos e qualitativos, em diferenciar com segurança amostras positivas e negativas para um agravo em particular (TDR DIAGNOSTICS EVALUATION EXPERT PANEL, 2010). Para determinar a sua validade, os seus resultados são comparados àqueles obtidos a partir de um padrão-ouro que, para a doença de Chagas crônica, é um conjunto de exames julgados adequados.

#### 6.1.1 Locais de experimentação e procedimentos

Os experimentos foram realizados no Serviço de Referência em Doença de Chagas (SRDC), localizado no Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE) e nos Laboratórios de Genômica e de Proteínas, do Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ-PR). A produção dos poliantígenos recombinantes foi realizada nos Laboratórios de Proteínas e Genômica. A avaliação do potencial diagnóstico dos poliantígenos recombinantes purificados do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (PRP-IBMP), incluindo padronização dos ensaios pela metodologia de ELISA e a realização dos ensaios a partir de então, foram realizadas no SRDC. Já a avaliação estrutural e funcional dos PRP-IBMP foi realizada no SRDC (FIOCRUZ-PE) e no Laboratório de Proteínas (FIOCRUZ-PR).

#### 6.1.2 Considerações éticas

Este estudo possui aprovação junto ao Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ-PE sob o número 388.527 de 04/09/2013 (CAAE 15812213.8.0000.5190, Anexo A). Não existiram riscos físicos para a saúde dos participantes, pois somente amostras previamente coletadas foram utilizadas. Os dados que os identifiquem foram mantidos em absoluto sigilo e, ao invés

do nome, o material biológico recebeu um código numérico, mantendo, desta forma, a sua confidencialidade.

## 6.2 Obtenção dos poliantígenos recombinantes

### 6.2.1 Expressão e purificação

Os PRP-IBMP são constituídos por sequências de antígenos imunogênicos já descritos na literatura (Quadro 4). Os detalhes das construções e dos processos de purificação não serão apresentados devido à confidencialidade industrial e por estarem em processo de depósito de patente.

**Quadro 4** - Composição dos PRP-IBMP

| PRP IBMP | Segmentos       | Denominações  | Referências* |
|----------|-----------------|---|--------------|
| 8.1      | Ag2/B13/CA-2    | <i>Surface antigen</i>  | Grupo A      |
|          | SAPA            | <i>Shed-acute-phase-antigen/Trans-sialidase</i>                   |              |
|          | RPL19           | <i>60S ribosomal subunit protein 19</i>                           |              |
| 8.2      | Ag1/H49/JL7/FRA | <i>Calpain cysteine peptidase/Cytoskeleton associated protein</i> | Grupo B      |
|          | SAPA            | <i>Shed-acute-phase-antigen/trans-sialidase</i>                   |              |
|          | Ag2/B13/CA-2    | <i>Surface antigen</i>  |              |
| 8.3      | Ag2/B13/CA-2    | <i>Surface antigen</i>  | Grupo C      |
|          | CRA/JL8/Ag30    | <i>Cytoplasmic repetitive antigen protein</i>                     |              |
|          | TcD             | <i>Trans-sialidase</i>  |              |
|          | RPL19           | <i>60S ribosomal subunit protein 19</i>                           |              |
| 8.4      | Ag2/B13/CA-2    | <i>Surface antigen</i>  | Grupo D      |
|          | SAPA            | <i>Shed-acute-phase-antigen/Trans-sialidase protein</i>           |              |
|          | R27-2           | -   |              |
|          | MAP             | <i>Microtubule-associated protein</i>                             |              |
|          | KMP-11          | <i>Kinetoplastid membrane protein</i>                             |              |
|          | FRA             | <i>Flagellar repetitive antigen</i>                               |              |

**Fonte:** O autor.

**\*Nota:** Grupo A: Houghton et al. (1996a), (1996b), (1999); Ibañez et al. (1988); Peralta et al. (1994). Grupo B: Cotrim et al. (1990); Gruber; Zingales (1993); Ibañez et al. (1988); Lafaille et al. (1989); Levin et al. (1989). Grupo C: Burns et al. (1992); Cotrim et al. (1990); Gruber; Zingales (1993); Houghton et al. (1999); Ibañez et al. (1988); Lafaille et al. (1989). Grupo D: Gruber; Zingales, (1993); Houghton et al. (2009); Ibañez et al. (1988); Kerner et al. (1991); Lafaille et al. (1989); Thomas et al. (2001).

### 6.2.2 Determinação da concentração

Os PRP-IBMP foram quantificados através de fluorimetria utilizando o equipamento Qubit 2.0 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). Esta metodologia utiliza corante fluorescente que emite sinais somente quando ligado às proteínas, ainda que na

---

presença de contaminantes de outra natureza. As amostras de interesse foram misturadas à solução fornecida pelo fabricante, incubadas por 2 minutos e a fluorescência emitida determinada pelo equipamento.

### 6.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Alíquotas dos PRP-IBMP (1 µg/poço) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970). Os géis de concentração (*stacking gel*) e de separação (*running gel*) foram preparados a uma concentração de acrilamida de 4,5% e 10%, respectivamente. Os PRP-IBMP-8.1, 8.2, 8.3 e 8.4 foram avaliados submetendo o gel à coloração pelo Coomassie Blue R250 (Bio-Rad). Como marcador de peso molecular foi utilizado o Kaleidoscope™ Prestained Standards (BioRad).

## 6.3 Padronização do ensaio imuno-enzimático indireto (ELISA indireto)

### 6.3.1 Seleção do sistema-tampão para sensibilização das microplacas

Os PRP-IBMP foram submetidos a diferentes condições de pH e força iônica visando obter informações sobre o conteúdo de estrutura secundária e estado de oligomerização. Para esta finalidade foram utilizadas as metodologias de dicroísmo circular (DC) e espalhamento dinâmico da luz (EDL) quando os PRP-IBMP encontravam-se nos sistemas-tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6), fosfato de sódio (50 mM pH 7,5) e ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (MES; 50 mM pH 5,5). O DC é uma ferramenta que possibilita determinar o conteúdo de estrutura secundária de proteínas estimando, desta forma, mudanças conformacionais induzidas por variações químicas (pH e agentes desnaturantes) e térmicas. Os espectros de CD para os PRP-IBMP foram determinados no espectropolarímetro JASCO J-815 (Hachioji, Tokio, Japão), equipado com um controlador de temperatura acoplado a um banho de água circulante, denominado *Peltier type CD/FL cell* (Jasco, Tokio, Japão). Foram utilizadas cubetas retangulares de quartzo de 1 mm de caminho óptico. O espectropolarímetro foi programado para gerar médias espectrais a partir de quatro aquisições e, em cada uma delas, mediu-se a elipicidade em graus na região do UV, no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 190 nm, com uma velocidade de 100 nm/min. O estado de agregação e

oligomerização dos PRP-IBMP foram avaliados através do EDL. Esta ferramenta permite determinar o raio hidrodinâmico das moléculas em suspensão e estimar suas massas. Quando uma fonte de luz como um laser, que possui uma frequência conhecida, incide sobre partículas em suspensão, a luz é espalhada, mas em uma frequência diferente. A esta mudança de frequência dá-se o nome efeito *Doppler*. Assim, relaciona-se o tamanho das partículas com a alteração na frequência da luz. Em virtude da velocidade média ser maior para partículas menores, há uma maior mudança na frequência comparada às partículas maiores e esta diferença que é utilizada para caracterizar um histograma de distribuição de tamanho de uma amostra de partículas. O coeficiente de difusão foi determinado a partir da taxa de decaimento de intensidade e foi utilizado para calcular o raio hidrodinâmico (Rh) da proteína através da equação de Stokes-Einsteis ( $DT=KBT(6\pi\eta Rh)^{-1}$ , onde T é a temperatura em Kelvin, kb é a constante de Boltzmann e  $\eta$  é a viscosidade do solvente). A aquisição dos dados foi realizada no equipamento *Dynamic Light Scattering DynaPro NanoStar* (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara-CA, EUA) e a sua análise no programa Dynamics 7.1.7.16.

### 6.3.2 Padronização dos componentes do ELISA indireto

Os ensaios imuno-enzimáticos indiretos no formato ELISA foram padronizados de forma a determinar a quantidade ótima dos PRP-IBMP, bem como a melhor titulação do anticorpo secundário (*checkboxoarder titration*) e das amostras séricas. Em microplacas de poliestireno de 96 cavidades de fundo chato (Nunc MaxiSorp<sup>®</sup>, EUA) foram distribuídos 100  $\mu$ l da solução tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6) contendo quantidades distintas dos antígenos recombinantes (200, 100, 50, 25 e 12,5 ng). Cada um dos PRP-IBMP foi utilizado separadamente como antígeno de captura. Após adição dos antígenos, a sensibilização ocorreu através do acréscimo de 100  $\mu$ l da solução *WellChampion*<sup>™</sup> lote 130703 (Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) por cavidade e, após um período de incubação de 15 min à temperatura ambiente, as microplacas foram esvaziadas por inversão e colocadas em estufa a 37°C por 20 minutos para secagem (Quimis<sup>®</sup> Estufa incubadora Q316M2, Diadema, Brasil). Ao final deste tempo, as microplacas encontravam-se prontas para uso.

Para a padronização do ELISA indireto foram utilizadas em duplicata amostras séricas de quatro indivíduos negativos e três positivos para a doença de Chagas nas diluições de 25, 50, 100 e 200 vezes utilizando o tampão PBS-T (fosfato de sódio 10 mM - Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, cloreto de



sódio 150 mM - NaCl e Tween-20 0,05%, pH 7,2) acrescido de extrato de *E. coli* 2%. Seis cavidades sem adição de antígeno (somente tampão de diluição, denominadas “SS”) e seis cavidades sensibilizadas, porém sem adição de amostra sérica (denominadas “branco”) foram utilizadas como controle negativo. Após sensibilização, 100 µl das amostras séricas diluídas foram adicionadas a cada cavidade. As placas foram seladas e incubadas em estufa a 37°C por 60 min (Quimis® Estufa incubadora Q316M2, Diadema, Brasil). Ao final deste período e com auxílio da lavadora de microplacas *Wellwash™ Microplater Washer* (Thermo Scientific™, Finlândia), as placas foram lavadas cinco vezes com adição de 300 µl de tampão PBS-T para retirada do material não adsorvido. A cada ciclo de lavagem, o tampão era deixado em contato com as cavidades por 1 min. Em seguida, foram adicionados 100 µl do anticorpo secundário diluído em PBS-T em cada cavidade. O anticorpo secundário, lote 135EXCJAP0047, foi conjugado à peroxidase no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED, Biomanguinhos, FIOCRUZ-RJ) e gentilmente cedido para a realização deste estudo. Trata-se de uma anti-globulina humana (anti-IgG) produzida a partir da inoculação de IgG humana em cabra, a qual encontrava-se em uma concentração final de 14 mg/ml. Para a padronização da reação de ELISA, o anticorpo secundário foi avaliado nas diluições de 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:4.000, 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000. As microplacas foram novamente seladas e incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos (Quimis® Estufa incubadora Q316M2, Diadema, Brasil). Ao final da incubação, as microplacas foram lavadas conforme descrito anteriormente. A cada cavidade foram adicionados 100 µl do substrato TMB Plus lote 111011 (Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) e, após 10 minutos e sob abrigo da luz, adicionou-se 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M com objetivo de parar as reações, as quais foram quantificadas no fotômetro de microplacas Multiskan® FC (Thermo Scientific™, Finlândia) com filtro de 450 nm. Para a interpretação dos dados, os valores de DO obtidos das cavidades denominadas branco foram subtraídos das DO das amostras. Em seguida as médias aritméticas dos valores das DO das amostras positivas e negativas foram calculadas, bem como os seus respectivos desvios padrão, utilizando o programa Microsoft Excel 2010. Os critérios estabelecidos para a determinação das condições ótimas basearam-se na maior distância entre a média aritmética das DO das amostras positivas daquela obtida para as amostras negativas acrescida à três desvios-padrão (DP). Além disto, foi estabelecido para esta padronização que a média aritmética das DO das amostras positivas deveriam obrigatoriamente ultrapassar valores de 1,000 e das amostras negativas não atingir o valor de 0,200, ou de 0,300 caso considerasse  $\bar{X} DO + 3DP$ .

### 6.3.3 Avaliação do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) como agentes bloqueadores

Com o objetivo de aperfeiçoar os resultados obtidos na padronização dos componentes do ELISA indireto, foi investigada a adição de SFB nas concentrações de 10,0%, 5,0% e 2,5% e de BSA nas concentrações de 2,0%, 1,0% e 0,5% ao tampão de diluição das amostras séricas. As reações de ELISA foram realizadas conforme descrito no subtópico 6.3.2. Para esta finalidade, foram utilizadas amostras séricas de 54 indivíduos negativos e 36 positivos para a doença de Chagas. Os resultados foram analisados de acordo com diferenças estatísticas das médias geométricas dos índices de reatividade (IR; relação DO/CO) das amostras positivas e negativas para cada uma das condições testadas e dos parâmetros de desempenho determinados.

## 6.4 Avaliação da estabilidade estrutural e funcional dos PRP-IBMP

### 6.4.1 Estabilidade a temperaturas extremas

A estabilidade a temperaturas extremas dos PRP-IBMP utilizando o sistema-tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6), foi determinada por desnaturação e renaturação através de aumento e posterior diminuição de temperatura e aquisição de dados por DC. O espectropolarímetro foi programado para gerar médias espectrais a partir de quatro aquisições e, em cada uma delas, mediu-se a elipicidade em graus na região do UV, no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 202 nm, com uma velocidade de 100 nm/min. Durante a desnaturação, as aquisições foram obtidas a cada 10°C, variando de 5°C a 85°C. Para a renaturação aquisições também foram obtidas a cada 10°C, porém no sentido inverso, ou seja, de 85°C a 5°C. Ao inserir no mesmo gráfico os espectros de desnaturação e renaturação à 5°C foi possível calcular a reversibilidade da desnaturação através da diferença do sinal de CD a 202 nm.

Os resultados dos experimentos conduzidos no espectropolarímetro foram comparados com análises cuja desnaturação térmica foi obtida com auxílio do termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf GA, Hamburgo, Alemanha). Entretanto, neste caso, o equipamento foi programado para permanecer 1, 5 e 10 minutos em cada patamar de temperatura. Ao final do ciclo de aquecimento e resfriamento a integridade dos PRP-IBMP foi verificada por SDS-

---

PAGE e a análise funcional através da reação do ELISA indireto utilizando 22 amostras negativas e 22 positivas para a doença de Chagas. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenho foram determinados para verificação do reconhecimento dos antígenos pré e pós-submissão às diferentes condições desnaturantes. O decaimento de reatividade foi avaliado ao comparar à reatividade dos antígenos no ponto zero (pré) daquela obtida nos pontos de 1, 5 e 10 minutos (pós).

#### 6.4.2 Estabilidade a temperatura ambiente

Os PRP-IBMP foram incubados a 25°C em sistema-tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6) em uma incubadora com temperatura controlada e sem agitação (Innova® 40 Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific, EUA). A verificação de alterações estruturais dos antígenos foi realizada por DC nos tempos de 0, 24, 72 e 96 horas. O espectropolarímetro foi programado para gerar médias espectrais a partir de quatro aquisições e, em cada uma delas, mediu-se a elipicidade em graus na região do UV, no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 200 nm, com uma velocidade de 100 nm/min. Através da análise da diferença do sinal de CD à 200 nm foi possível calcular quantidade estruturas secundárias resultantes nos diferentes momentos de análise. A verificação da integridade das bandas foi realizada por meio de SDS-PAGE e a análise funcional através da reação de ELISA indireto, incluindo nesta abordagem o tempo de 120 horas. Assim, 46 amostras negativas e 46 positivas para a doença de Chagas foram submetidas à reação de ELISA. A avaliação dos PRP-IBMP pré e pós-submissão às diferentes condições desnaturantes foi realizada através da determinação das médias geométricas dos IR e dos parâmetros de desempenhos. O decaimento do IR foi avaliado ao comparar à reatividade dos antígenos antes e após estresse térmico.

#### 6.4.3 Estabilidade de longa duração

O objetivo deste experimento foi investigar a reatividade dos PRP-IBMP por um período prolongado. Para tal, oito microplacas de cada antígeno foram sensibilizadas e armazenadas a 4°C em embalagens individuais cuidadosamente lacradas na presença de agente dessecante. Para a realização dos ensaios imuno-enzimáticos, 46 amostras negativas e 46 positivas para a doença de Chagas foram aliquotadas em oito conjuntos e armazenadas a -

---

20°C. Os testes foram realizados entre os dias 15 e 20 dos meses de agosto, setembro, outubro, novembro e dezembro de 2014 e janeiro, abril e agosto de 2015, totalizando oito pontos de análise distribuídos em um período de doze meses. Em cada um deles, as microplacas e um conjunto de amostras séricas eram removidas do armazenamento e a reação de ELISA realizada. A determinação dos parâmetros de desempenho e das médias geométricas dos IR foi realizada para cada um dos pontos de análise. Já o decaimento de reatividade foi analisado ao comparar à reatividade dos antígenos no ponto inicial (agosto de 2014) daquela obtida para os períodos subsequentes.

## 6.5 População do estudo

### 6.5.1 Dimensionamento amostral

A amostragem foi dimensionada com auxílio do programa estatístico R (*The R Project for Statistical Computing*, Viena, Áustria) para estimação de proporções, supondo-se sensibilidade de 99% e especificidade de 99%, adotando-se um erro absoluto (semi-amplitude do intervalo de confiança) de 2% e nível de confiança em 95%. Para avaliação de reações cruzadas foi utilizada a estimativa da distribuição binominal negativa, extrapolando em 5% o quantitativo de reações cruzadas possivelmente encontradas para outras doenças infecciosas.

### 6.5.2 Obtenção dos painéis sorológicos

Amostras séricas oriundas de Instituições parceiras, localizadas em diferentes regiões do Brasil, foram selecionadas visando sua utilização como referência para o teste em desenvolvimento e permitindo avaliar o potencial diagnóstico dos PRP-IBMP. Dessa forma, os painéis foram compostos por amostras da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná e Pernambuco, além de amostras de painéis comerciais, sendo oriundas de países das Américas Central, do Norte e do Sul.

Em Pernambuco, as amostras foram obtidas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Fundação Hemope) e do Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN-PE). O CPqAM, por meio do Serviço de Referência em Doença de Chagas (SRDC), forneceu amostras séricas positivas e negativas para a doença de Chagas oriundas de demanda

---

espontânea para realização de diagnóstico sorológico. Além disso, foram obtidas amostras com sorologia positiva para hepatite B, hepatite C e HTLV e com exame parasitológico positivo para esquistossomose e leishmaniose, as quais compõem a soroteca do referido Serviço. O Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF), também situado no CPqAM, forneceu amostras de indivíduos positivos para filariose diagnosticadas por meio de filtração em membrana de policarbonato. O Serviço de Referência em Leishmaniose (SRL), do CPqAM, forneceu amostras de leishmaniose tegumentar para avaliação de reações cruzadas. A Fundação Hemope, por sua vez, forneceu amostras de indivíduos negativos para as doenças transmitidas por sangue (hepatites B e C, sífilis, HIV, HTLV e doença de Chagas), amostras com sorologia positiva para sífilis, hepatite B, hepatite C, HIV, HTLV, doença de Chagas e amostras de indivíduos infectados com duas ou mais destas patologias (co-infecções). O acesso às informações dos doadores e a seleção das amostras foi realizado seis meses após a guarda da soroteca, tempo legalmente necessário para retenção das amostras biológicas. No momento do descarte as amostras foram selecionadas e enviadas ao SRDC. O LACEN-PE forneceu amostras com sorologia positiva para leishmaniose, leptospirose, doença de Chagas, sarampo, rubéola, HIV, HTLV, hepatite B, hepatite C, filariose e dengue. As amostras foram diagnosticadas nos Setores de Virologia e de Microbiologia por meio de metodologias padrão. Após seleção das amostras, uma alíquota de 200 µl foi encaminhada ao SRDC.

As amostras séricas oriundas da Bahia, Minas Gerais e Goiás foram obtidas do Laboratório de Pesquisa da Doença Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG). Alíquotas de soro de indivíduos com sorologia positiva e negativa para a doença de Chagas diagnosticadas por quatro testes sorológicos distintos (ELISA convencional e recombinante, imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta) foram separadas e encaminhadas ao SRDC. Amostras de indivíduos com sorologia positiva para hepatite B e leishmaniose também foram obtidas para este estudo.

As amostras séricas oriundas do Paraná foram cedidas pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP/TECPAR). Alíquotas séricas de amostras positivas e negativas para doença de Chagas provenientes do LACEN-PR, mas pertencentes à soroteca do IBMP, foram enviadas ao SRDC. Adicionalmente foram igualmente cedidos painéis comerciais de referência das Empresas SeraCare Life Sciences, Inc (Milford-MA, EUA) e da BBI (Boston Biomedical, Inc. Norwood-MA, EUA). As amostras componentes desses painéis apresentam diferentes características de reatividade e são separadas por doença em diferentes painéis de

---

soro-conversão, controle de qualidade, reatividade e sensibilidade (sífilis, HIV, HTLV, doença de Chagas, soronegativas para doenças transmitidas por sangue e triadas por bancos de sangue, hepatite B, hepatite C e co-infecção pelos vírus das hepatites B e C). Além disso, o IBMP cedeu alíquotas de amostras séricas provenientes do painel de Análise Externa da Qualidade (AEQ), utilizado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-FIOCRUZ/RJ, Brasil) para validação e controle de qualidade dos kits diagnósticos utilizados pela Hemorede do Brasil. O painel AEQ tem como característica soros com alta reatividade aos marcadores das doenças, sendo composto por amostras tanto positivas quanto negativas para HIV, HCV, HBV, HTLV, sífilis e doença de Chagas.

Após chegada ao SRDC as amostras foram catalogadas, codificadas e armazenadas a -20°C. Todas as amostras utilizadas neste estudo encontravam-se armazenadas nas sorotecas em suas respectivas Instituições de origem, não havendo, portanto, necessidade de intervenções físicas nos pacientes.

### 6.5.3 Definição do padrão-ouro e caracterização do painel sorológico

O Ministério da Saúde preconiza que o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas deve ser conduzido utilizando dois testes de princípios metodológicos distintos ou pela mesma metodologia, porém com diferentes preparações antigênicas (BRASIL, 2005). Desta maneira, a seleção dos kits para a composição do padrão-ouro baseou-se na Nota Técnica N°03/06 do Ministério da Saúde, que avaliou o desempenho dos kits comercializados no Brasil que possuíam, naquela ocasião, registro ativo na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2006). A Nota Técnica recomenda que os kits utilizados para o diagnóstico da doença de Chagas apresentem sensibilidade e especificidade iguais ou maiores que 99% e 97%, respectivamente. Atualmente somente cinco dos doze kits analisados apresentam registro ativo na ANVISA, e quatro dos quais satisfazem as recomendações preconizadas acima. Com base nestas informações, foi realizado um estudo comparativo entre o Elisa Chagas III (BiosChile, Grupo Bios, Santiago, Chile; Lote 1F130525), o Imuno-Elisa Wama (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brasil; Lote 14D061), o Pathozyme® Chagas (Omega Diagnostics, Escócia, Reino Unido; Lote 7042779) e o Gold Elisa Chagas (Rem, São Paulo, Brasil; Lote CHA132A), utilizando 499 amostras negativas e 186 positivas para a doença de Chagas, sendo estas últimas provenientes de pacientes clínica e epidemiologicamente caracterizados e acompanhados pelo Ambulatório de doença de Chagas e Insuficiência

---

Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) – (UPE), Brasil, as quais foram coletadas entre 2005 e 2011 e fazem parte do acervo sorológico do SRDC. Ao final desta avaliação, os dois kits que apresentaram os melhores parâmetros de desempenho foram selecionados para compor o padrão-ouro, sendo utilizados para verificação da condição sorológica do painel sorológico obtido conforme descrito no subtópico 6.5.2.

Além do mais, foi utilizado o teste de imunofluorescência indireta para leishmaniose humana, cedido por Biomanguinhos (FIOCRUZ-RJ, Brasil; Lote 139LH003Z), com o objetivo de verificar se as reações falso-positivas obtidas através da utilização dos PRP-IBMP ocorreram devido à reação cruzada com leishmaniose.

#### 6.5.4 Critérios de inclusão das amostras

Foram incluídas neste estudo amostras séricas de indivíduos sorologicamente positivos ou negativos para a doença de Chagas, bem como de indivíduos com diagnóstico laboratorial positivo para outras doenças infecto-parasitárias, porém negativas para a doença de Chagas. Portanto, como critérios de inclusão foram adotadas as definições abaixo:

- a) Amostras séricas positivas para a doença de Chagas: são aquelas com sorologia positiva em dois testes com princípios metodológicos ou preparações antigênicas diferentes e com registro ativo na ANVISA;
- b) Amostras séricas negativas para a doença de Chagas: são aquelas com sorologia negativa em dois testes com princípios metodológicos ou preparações antigênicas diferentes e com registro ativo na ANVISA;
- c) Amostras séricas positivas para outras doenças e negativas para doença de Chagas: são aquelas que apresentam positividade em metodologias diagnósticas padrão-ouro para dengue, esquistossomose, filariose, hepatites B e C, HIV, HTLV, leishmaniose, rubéola, sarampo e sífilis; porém negativas para a doença de Chagas, conforme definição anterior.

#### 6.5.5 Critérios de exclusão

Foram excluídas deste estudo as amostras séricas que apresentaram volumes inferiores a 50 µl e aquelas com avaliação sorológica duvidosa para a doença de Chagas. Este último critério refere-se aos resultados discordantes entre testes de referência adotados neste estudo,

ou seja, amostras com resultado positivo em um teste e negativo no outro (ou vice-versa) e amostras com resultado na zona cinza em um ou ambos os testes.

## 6.6 Expressão e análise dos resultados

### 6.6.1 Definição do ponto de corte (CO - *cut-off*)

O CO foi determinado individualmente para cada microplaca (unidade individual de análise). Os dados das DO foram exportados para o programa computacional GraphPad Prism 6 para Windows versão 6.01 (GraphPad Software Inc., EUA) e os valores de CO definidos a partir da análise da curva ROC (GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2000). A área abaixo da curva ROC (AUC – *area under ROC*) foi calculada utilizando intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

### 6.6.2 Normalização dos dados

A normalização dos dados teve como finalidade a uniformização dos resultados evitando, desta forma, variabilidade inerente a cada unidade individual de análise. Para cada amostra foi calculado o índice de reatividade (IR) (GOUBAU et al., 1997), como descrito abaixo:

$$\text{Índice de reatividade (Dado normalizado)} = \frac{\text{DO da amostra}}{\text{Valor do CO}}$$

Considerou-se não-reagente toda amostra com IR inferior a 1,00 e reagente toda amostra com relação igual ou superior a 1,00. Com o objetivo de evitar erros grosseiros foi utilizado como critério de repetição todas as amostras com IR entre 0,80 e 1,20, independente de sua condição sorológica. Para efeito de análise, foram consideradas fracamente reativas amostras com IR entre 1,00 e 4,99 e fortemente reativas aquelas com sinal igual ou superior a 5,00 (GOUBAU et al., 1997). Os IR foram representados em gráficos obtidos pelo programa computacional GraphPad Prism 6 para Windows versão 6.01 (GraphPad Software Inc., EUA).



### 6.6.3 Avaliação dos parâmetros de desempenho

A avaliação do potencial diagnóstico dos PRP-IBMP foi realizada através da utilização de parâmetros que descrevem o desempenho de um teste diagnóstico, como sensibilidade, especificidade, exatidão, índice de Younden (J) e razões de verossimilhança, juntamente com seus intervalos de confiança (OUCHCHANE; RABILLOUD; BOIRE, 2009). Para esta finalidade, foram utilizadas tabelas de dupla entrada (tabelas 2 x 2) relacionando os resultados obtidos através da utilização dos PRP-IBMP com aqueles obtidos através do padrão-ouro anteriormente definido (Figura 11).

**Figura 11** - Combinação binária entre os prováveis resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença

|       |          | Padrão Ouro                |                            |         |               |
|-------|----------|----------------------------|----------------------------|---------|---------------|
|       |          | Com doença                 | Sem doença                 |         |               |
| Teste | Positivo | Verdadeiro Positivos<br>VP | Falso Positivos<br>FP      | VP + FP |               |
|       | Negativo | Falso Negativos<br>FN      | Verdadeiro Negativos<br>VN | FN + VN | VP+FP + FN+VN |
|       |          | VP + FN                    | FP + VN                    |         |               |

**Fonte:** O autor.

**Nota:** Tabela de dupla entrada ou 2 x 2.

**Legenda:** FN (falso negativos); FP (falso positivos); VN (verdadeiro negativos); VP (verdadeiro positivos).

A partir desta tabela alguns conceitos podem ser formulados e os parâmetros de desempenho calculados, tais como:

- Verdadeiro Positivos (VP): são amostras que possuem resultado positivo no teste dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como positivo para a doença de Chagas;
- Verdadeiro Negativos (VN): são amostras que possuem resultado negativo no teste dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como negativo para a doença de Chagas;

- c) Falso Positivos (FP): são amostras que possuem resultado positivo no teste dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como negativo para a doença de Chagas;
- d) Falso Negativos (FN): são amostras que possuem resultado negativo no teste dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como positivo para a doença de Chagas.

Assim, sensibilidade (Sen) é definida como a probabilidade de um resultado ser positivo pelo teste dentre as amostras sorologicamente positivas para a doença de Chagas, expressando, desta forma, o total de acertos sobre o verdadeiro número de amostras positivas. Evidentemente, quanto mais próxima de 1 (ou 100%) estiver a sensibilidade, melhor será o desempenho de teste. Esta probabilidade condicional  $P(T+|D)$  é definida entre os indivíduos doentes e é estimada conforme a fórmula abaixo:

$$Sen = \frac{VP}{VP + FN}$$

A especificidade (Esp) é definida como a probabilidade de um resultado ser negativo pelo teste dentre as amostras sorologicamente negativas para a doença de Chagas. Assim, esta propriedade expressa o total de testes corretamente negativos sobre o total de amostras negativas para a doença. De forma semelhante à sensibilidade, quanto mais próxima de 1 estiver a especificidade, melhor será o desempenho do teste. Esta probabilidade condicional  $P(T-|S)$  é definida entre os indivíduos sadios e é estimada conforme a fórmula abaixo:

$$Esp = \frac{VN}{VN + FP}$$

Os valores dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) para a sensibilidade e especificidade foram calculados conforme as fórmulas abaixo:

$$IC95\% = \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{Sen \times (1 - Sen)}{ND}} \quad \text{e} \quad IC95\% = \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{Esp \times (1 - Esp)}{NS}}$$

Onde:

ND = número de doentes

NS = número de sadios

A exatidão (*Exa*) foi calculada conforme a fórmula abaixo. Este parâmetro refere-se aos resultados corretamente classificados (*VP* e *VN*) no universo de amostras avaliadas, ou seja, representa a proporção de diagnósticos corretos. Este parâmetro é também denominado de acurácia, eficiência ou precisão diagnóstica. O seu valor varia de 0 a 1, sendo que 1 (ou 100%) corresponde ausência de resultados falso positivos e falso negativos.

$$Exa = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN}$$

O índice de Youden (*J*) (SCHISTERMAN et al., 2005; YODEN, 1950) foi um parâmetro utilizado para avaliar a precisão de um teste diagnóstico. O seu valor varia de -1 a 1, sendo que valores iguais a 1 indicam ausência de resultados falso negativos e falso positivos (teste perfeito). Este índice foi calculado como segue abaixo:

$$J = Sen + Esp - 1$$

A proporção de resultados *FP* (*PFP*) demonstra a probabilidade que uma amostra negativa seja classificada como positiva. Em outras palavras é a proporção de amostras negativas erroneamente classificadas como positivas. Por outro lado, a proporção de resultados *FN* (*PFN*) é dada como a probabilidade de uma amostra positiva seja classificada como negativa, ou seja, é a proporção de amostras positivas erroneamente classificadas como negativas.

$$PFP = \frac{FP}{FP + VN} \quad 0 \leq PFP \leq 1$$

$$PFN = \frac{FN}{VP + FN} \quad 0 \leq PFN \leq 1$$

A taxa de erro total (*ET*) foi calculada como descrito abaixo:

$$ET = \frac{FP + FN}{VP + FP + FN + VN} \quad 0 \leq ET \leq 1$$

As razões de verossimilhança (RV), ou coeficientes de probabilidade, permitem quantificar informações precisas de um novo teste. As RV foram calculadas com o objetivo de verificar se os resultados obtidos com a utilização dos PRP-IBMP aumentam ou diminuem a probabilidade de diagnosticar laboratorialmente a doença de Chagas. Estes parâmetros têm como característica reunir em um único estimador os valores de Sen e Esp, constituindo uma medida global de poder discriminante de um teste diagnóstico. Possuem um significado semelhante ao de risco relativo, indicando quantas vezes aumenta a probabilidade de encontrar um determinado resultado no teste em uma amostra que tenha ou não determinada característica. Portanto, um novo teste diagnóstico será inútil se  $RV=1$  (ou se o  $IC_{95\%}$  incluí-lo), já que não discrimina entre os positivos e os negativos. A prova é melhor, mais útil, discrimina mais, quando os valores de RV diferem de 1. Conforme o Quadro 5, valores de RV acima de 1 indicam aumento da probabilidade de que a doença esteja presente; valores abaixo de 1 indicam que o novo teste não agrega valor diagnóstico.

**Quadro 5** - Interpretação dos valores das razões de verossimilhança

| Resultados possíveis | Interpretação                              |
|----------------------|--|
| <b>RV &gt; 10</b>    | Aumento significativo da probabilidade     |
| <b>RV 5 a 10</b>     | Aumento moderado da probabilidade          |
| <b>RV 2 a 5</b>      | Aumento pequeno da probabilidade           |
| <b>RV 1 a 2</b>      | Aumento insignificante da probabilidade    |
| <b>RV = 1</b>        | Sem significado estatístico                |
| <b>RV 0,5 a 1</b>    | Diminuição insignificante da probabilidade |
| <b>RV 0,2 a 0,5</b>  | Diminuição pequena da probabilidade        |
| <b>RV 0,1 a 0,2</b>  | Diminuição moderada da probabilidade       |
| <b>RV &lt; 0,1</b>   | Diminuição significativa da probabilidade  |

**Fonte:** Modificado de Ouchchane; Rabilloud; Boire (2009).

**Legenda:** RV (razão de verossimilhança).

Dessa forma, os testes diagnósticos com resultado dicotômico possuem dois coeficientes de probabilidade possíveis: o positivo e o negativo. A RV positiva (RV+) corresponde quantas vezes aumenta a probabilidade de encontrar um resultado positivo em uma amostra que seja positiva (sensibilidade) do que em uma amostra negativa (complemento da especificidade). A RV negativa (RV-) indica quantas vezes aumenta a probabilidade de encontrar um resultado negativo em uma amostra positiva (complemento da sensibilidade) do que em uma amostra negativa (especificidade). Ambos os parâmetros foram calculados como segue abaixo:

$$RV+ = \frac{Sen}{1 - Esp} \qquad RV- = \frac{1 - Sen}{Esp}$$

#### 6.6.4 Avaliação da reprodutibilidade

Reprodutibilidade é definida como a concordância de resultados em testes do mesmo formato realizados com a mesma amostragem e nas mesmas condições por diferentes operadores e, em algumas situações, em lugares diferentes. A variação da reprodutibilidade foi calculada pelo desvio padrão (DP) ou pelo coeficiente de variação (CV), expressos pelas fórmulas:

$$DP = \frac{\sqrt{\sum(X - \mu_x)^2}}{N - 1} \quad \text{e} \quad CV = \frac{DP \times 100}{\mu_x}$$

Onde:

X = valor encontrado para cada teste

$\mu_x$  = valor médio

N = número total de testes realizados

A avaliação qualitativa da reprodutibilidade foi realizada através da determinação do índice de Kappa de Cohen ( $\kappa$ ), o qual mede o grau de concordância entre medidas da mesma variável categórica que não acontece ao acaso. Esta medida tem como valor máximo 1,00 que representa concordância total entre as avaliações e valor mínimo zero, indicando ausência de concordância entre as avaliações. Os valores do índice  $\kappa$  e do IC95% foram calculados como descrito abaixo, onde  $P_o$  representa a probabilidade observada e  $P_e$  a probabilidade esperada:

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} \quad \text{e} \quad IC95\% = \kappa \pm 1,96 \sqrt{\frac{P_o (1 - P_o)}{n (1 - P_e)(1 - P_e)}}$$

A interpretação do índice  $\kappa$  foi realizada de acordo com o Quadro 6 (LANDIS; KOCH, 1977).

**Quadro 6** - Interpretação do índice de Kappa de Cohen ( $\kappa$ )

| Índice $\kappa$ | Concordância   |
|-----------------|----------------|
| > 0,00          | Nenhuma        |
| 0,00 a 0,20     | Fraca          |
| 0,21 a 0,40     | Razoável       |
| 0,41 a 0,60     | Regular        |
| 0,61 a 0,80     | Moderada       |
| 0,81 a 0,99     | Quase perfeita |
| 1,00            | Perfeita       |

**Fonte:** Modificado de Landis; Kock (1977).

**Legenda:**  $\kappa$  (índice de Kappa de Cohen).

### 6.6.5 Testes estatísticos

A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de medidas descritivas como: médias aritmética e geométrica, desvio padrão e coeficiente de variação. As médias geométricas foram calculadas com os seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC95%). As médias aritméticas foram utilizadas para a padronização dos componentes do ELISA. Para as demais análises foi utilizada a média geométrica. Para testar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk e quando da rejeição da hipótese nula foi utilizado o teste de Wilcoxon. No caso de confirmação da normalidade dos dados foi utilizado o teste T de Student pareado. Para avaliação da correlação entre os IR dos PRP-IBMP e dos kits comerciais foi determinado o coeficiente de correlação de Spearman. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de  $p < 0,05$ . A ausência de sobreposição dos valores dos IC95% foi considerada significância estatística. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6 para Windows versão 6.01 (GraphPad Software Inc., EUA) para realização dos testes estatísticos.

## 6.7 Avaliação do potencial diagnóstico dos PRP-IBMP

### 6.7.1 Estudo de fase I

O objetivo deste estudo foi determinar a capacidade que os PRP-IBMP possuem em discriminar amostras positivas das negativas. Para tal, foram utilizadas 280 amostras séricas positivas e 20 negativas para a doença de Chagas. As reações de ELISA foram realizadas

---

como descrito no subtópico 6.3.2. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenho foram determinados para cada um dos antígenos.

#### 6.7.2 Estudo de fase II

O estudo de fase II foi realizado com a finalidade de avaliar o potencial diagnóstico dos PRP-IBMP. Com esta finalidade, foram utilizadas 857 amostras séricas positivas e 689 negativas para a doença de Chagas. As amostras foram avaliadas conjuntamente e subdivididas nas regiões geográficas das quais foram oriundas, a saber: Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná e Pernambuco, além da utilização de painéis comerciais. As reações de ELISA foram realizadas como descrito no subtópico 6.3.2. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenhos foram determinados para cada um dos antígenos. Os valores de IR e dos parâmetros de desempenho e de IR foram comparados entre as moléculas a fim de verificar possível capacidade diagnóstica.

#### 6.7.3 Sinergia entre os PRP-IBMP: misturas equimolares

Com objetivo de avaliar sinergia entre os PRP-IBMP em misturas equimolares um estudo foi realizado utilizando 46 amostras positivas e 46 negativas para a doença de Chagas. As reações de ELISA foram realizadas como descrito no subtópico 6.3.2. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenho foram determinados para cada um dos antígenos. Inicialmente as moléculas foram avaliadas isoladamente e, posteriormente, em misturas contendo dois, três ou quatro antígenos.

#### 6.7.4 Reações cruzadas

A investigação de possíveis reações cruzadas foi conduzida através da utilização de amostras séricas de indivíduos portadores de doenças infecto-parasitárias, são elas: dengue, esquistossomose, filariose, hepatite B, hepatite C, HIV, HTLV, leishmaniose, leptospirose, rubéola, sarampo e sífilis; porém negativas para a doença de Chagas. As reações de ELISA foram realizadas como descrito no subtópico 6.3.2 e as médias geométricas dos IR e os parâmetros de desempenho foram determinados para cada um dos antígenos.

---

## 6.7.5 Reprodutibilidade

### 6.7.5.1 *Intraplaca (Repetitividade)*

Na avaliação da reprodutibilidade intraplaca foram utilizadas 23 amostras negativas e 23 positivas para a doença de Chagas, as quais foram analisadas em duplicata (determinação 1 e determinação 2). As reações de ELISA foram realizadas como descrito no subtópico 6.3.2. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenho foram calculados para as duas determinações e os resultados comparados entre elas.

### 6.7.5.2 *Entre lotes*

Com o objetivo de verificar a reprodutibilidade entre diferentes lotes de produção, as médias geométricas dos IR e os parâmetros de desempenho dos lotes 1 e 2 dos PRP-IBMP foram comparados utilizando 45 amostras positivas e 46 negativas para a doença de Chagas. As reações de ELISA foram realizadas como descrito no subtópico 6.3.2 e os resultados analisados como descrito no subtópico 6.7.5.1.

### 6.7.5.3 *Entre laboratórios*

Nesta avaliação foi utilizado o método simples cego, no qual as amostras foram codificadas de modo que o operador externo não reconhecesse a sua condição sorológica. Assim, 46 amostras negativas e 38 positivas para a doença de Chagas foram codificadas e enviadas ao LATED (Biomanguinhos, FIOCRUZ-RJ) juntamente com as microplacas sensibilizadas, reativos e bula. Os ensaios realizados externa e internamente foram conduzidos como descrito no subtópico 6.3.2. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenhos foram determinados para as duas determinações e os resultados comparados entre elas.

## 6.7.6 Concordância de desempenho com kits comerciais

Para avaliar a concordância dos PRP-IBMP com kits comerciais foram testadas 688 amostras negativas e 854 positivas para a doença de Chagas, em paralelo com o Gold Elisa



---

Chagas lote CHA132A (REM Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) e o Pathozyme<sup>®</sup> Chagas lote 7042779 (Omega Diagnostics, Escócia, Reino Unido). Ademais, foram também avaliadas 932 amostras negativas para a doença de Chagas, porém positivas para dengue (n=50), esquistossomose (n=42), filariose (n=51), hepatite B (n=158), hepatite C (n=84), HIV (n=140), HTLV (n=108), leishmaniose (n=16), leptospirose (n=90), rubéola (n=13), sarampo (n=20), sífilis (n=138) e 22 de co-infecções, a saber: HIV e sífilis (n=7), hepatite B e sífilis (n=2), hepatite C e sífilis (n=2), HTLV e sífilis (n=1), HIV e hepatite B (n=1), hepatite B e hepatite C (n=7), hepatite C, hepatite B e sífilis (n=1) e hepatite C, HTLV e sífilis (n=1). As reações de ELISA foram realizadas de acordo com as recomendações dos fabricantes. Ao final das reações os resultados foram normalizados com objetivo de torná-los comparáveis quantitativamente àqueles obtidos para os PRP-IBMP. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenhos foram determinados e os resultados comparados aos dos PRP-IBMP.

#### 6.7.7 Análise dos resultados inconclusivos

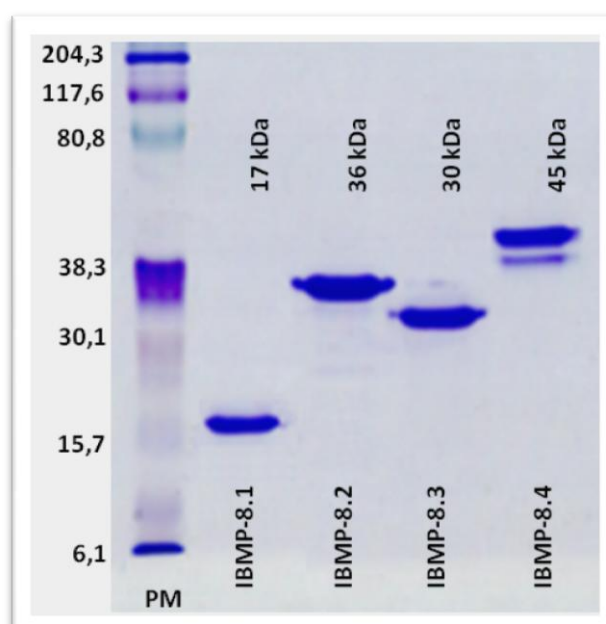
Amostras séricas previamente diagnosticadas como positivas para a doença de Chagas pelas Instituições parceiras e que não participaram deste estudo por não se adequarem aos critérios de inclusão estabelecidos no subtópico 6.5.4, foram avaliadas quanto a sua capacidade de serem reconhecidas pelas moléculas IBMP tanto isoladamente quanto em combinações (conjuntos de interseções) compostas por dois ou mais testes. Os ensaios foram conduzidos como descrito no subtópico 6.3.2 e a análise gráfica dos conjuntos de interseção gerada a partir de uma ferramenta interativa de uso livre encontra-se disponível na internet (UPSET, 2015).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 SDS-PAGE

A análise eletroforética dos PRP-IBMP mostrou presença de bandas intensas e bem conservadas para as quatro moléculas, com exceção para a pequena degradação observada no PRP-IBMP-8.4 (Figura 12).

**Figura 12** - SDS-PAGE dos PRP-IBMP corados pelo azul de Coomassie R250



**Fonte:** O autor.

**Nota:** Em cada poço foi depositado 1 µg do antígeno.

**Legenda:** PM = peso molecular em quilodaltos (kDa) (aprotinina – 6,1; lisozima – 15,7; inibidor de tripsina da soja – 30,1; anidrase carbônica – 38,3; BSA – 80,8; β-galactosidase – 117,6; miosina – 204,3).

### 7.2 Determinação da concentração

Dois lotes de PRP-IBMP foram produzidos e purificados, sendo o lote 1 utilizado para o estudo do potencial diagnóstico e o segundo para caracterização da estrutura secundária em diferentes condições físico-químicas (Tabela 1).

**Tabela 1** - Lotes de produção dos PRP-IBMP

| Lotes | PRP-IBMP | Lote de produção | Concentração (mg/mL) | Finalidade de uso  |
|-------|----------|------------------|----------------------|--|
| 1     | 8.1      | 150613           | 0,5                  | Análise do potencial diagnóstico e<br>Ensaio de Reprodutibilidade          |
|       | 8.2      | 270613           | 0,7                  |  |
|       | 8.3      | 020913           | 1,0                  |  |
|       | 8.4      | 080813           | 1,8                  |  |
| 2     | 8.1      | 180613           | 1,3                  | Caracterização da estrutura<br>secundária e<br>Ensaio de Reprodutibilidade |
|       | 8.2      | 180613           | 2,0                  |  |
|       | 8.3      | 291013           | 3,0                  |  |
|       | 8.4      | 090813           | 4,2                  |  |

Fonte: O autor.

### 7.3 Padronização do ELISA indireto

#### 7.3.1 Seleção do sistema-tampão para sensibilização das microplacas

Os resultados do EDL e os espectros de DC, obtidos quando os PRP-IBMP encontravam-se nos sistemas-tampão carbonato de sódio (50 mM pH 9,6), fosfato de sódio (50 mM pH 7,5) e MES (50 mM pH 5,5), encontram-se descritos na Tabela 2 e na Figura 13, respectivamente.

**Tabela 2** – Análise do espalhamento dinâmico da luz para os PRP-IBMP

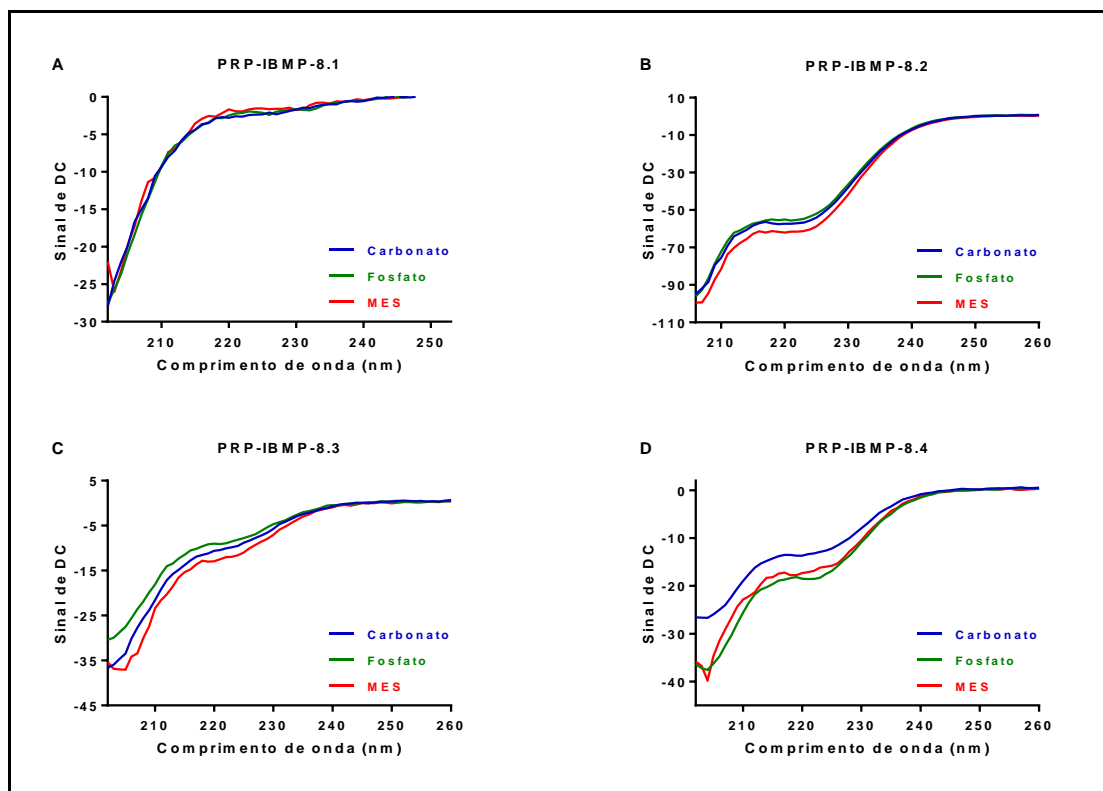
| PRP IBMP                                 | Massa (%) | Raio hidrodinâmico (nm) | Peso molecular (kDa) | Polidispersividade (%) |
|--|-----------|-------------------------|----------------------|------------------------|
| <b>Carbonato de sódio (50 mM pH 9,6)</b> |           |                         |                      |                        |
| 8.1                                      | 94,0      | 2,3                     | 24                   | 7,2                    |
| 8.2                                      | 99,8      | 3,8                     | 76                   | 15,5                   |
| 8.3                                      | 97,9      | 3,9                     | 80                   | 10,2                   |
| 8.4                                      | 97,7      | 4,2                     | 98                   | 14,3                   |
| <b>Fosfato de sódio (50 mM pH 7,5)</b>   |           |                         |                      |                        |
| 8.1                                      | 96,6      | 2,1                     | 20                   | 11,8                   |
| 8.2                                      | 99,5      | 3,7                     | 72                   | 18,1                   |
| 8.3                                      | 99,3      | 4,1                     | 94                   | 11,5                   |
| 8.4                                      | 97,7      | 4,3                     | 103                  | 23,7                   |
| <b>MES (50 mM pH 5,5)</b>                |           |                         |                      |                        |
| 8.1                                      | 79,6      | 2,7                     | 35                   | 11,8                   |
| 8.2                                      | 94,5      | 3,5                     | 65                   | 15,9                   |
| 8.3                                      | 99,3      | 3,3                     | 57                   | 28,2                   |
| 8.4                                      | 99,5      | 4,0                     | 84                   | 34,2                   |

Fonte: O autor.

Nota: Moléculas em forma dimérica e trimérica.

Legenda: MES (ácido 2-N-morfolinoetanosulfônico).

**Figura 13** – Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular dos PRP-IBMP em diferentes sistemas-tampão



**Fonte:** O autor.

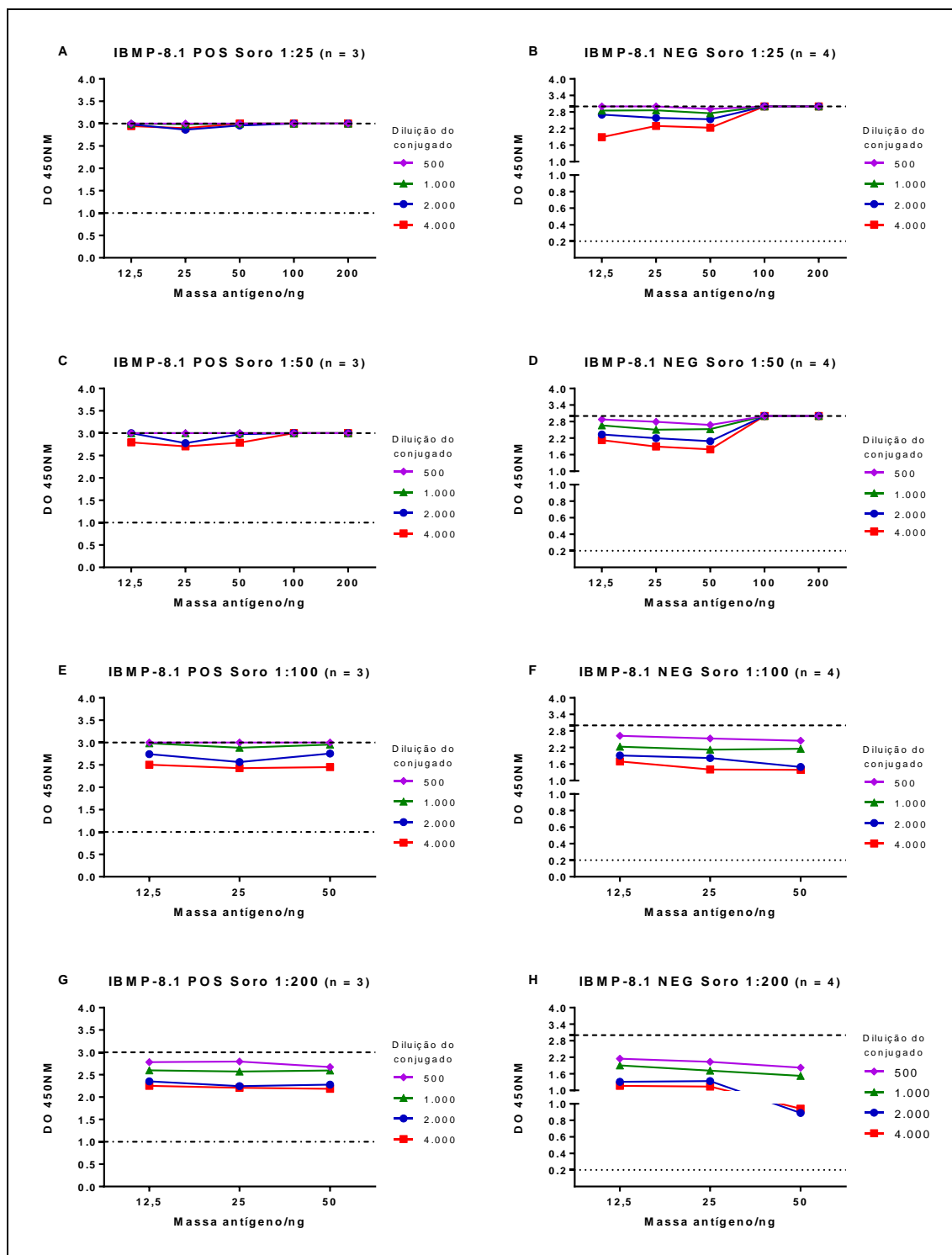
**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3; (D) PRP-IBMP-8.4. Linha azul - Carbonato de sódio (50 mM pH 9,6); Linha verde - Fosfato de sódio (50 mM pH 7,5); Linha vermelha - MES (50 mM pH 5,5).

**Legenda:** DC (dicroísmo circular); MES (ácido 2-N-morfolinoetanosulfônico).

### 7.3.2 Padronização dos componentes do ELISA indireto

O PRP-IBMP-8.1 foi avaliado inicialmente utilizando as quantidades de 200, 100, 50, 25 e 12,5 ng do antígeno por cavidade, além de diferentes diluições do anticorpo conjugado (500, 1.000, 2.000 e 4.000 vezes) e das amostras séricas, a saber: 25 (Figuras 14A e 14B), 50 (Figuras 14C e 14D), 100 (Figuras 14E e 14F) e 200 vezes (Figuras 14G e 14H). Posteriormente, o experimento foi repetido utilizando 50, 25 e 12,5 ng do antígeno por cavidade e amostras séricas diluídas 100 (Figuras 15A e 15B) e 200 vezes (Figuras 15C e 15D). Nesta nova situação o conjugado foi usado quando diluído 20.000, 40.000 e 80.000 vezes.

**Figura 14** - Análise gráfica dos valores médios de absorvância do PRP-IBMP-8.1 com diluição sérica de 25, 50, 100 e 200 vezes

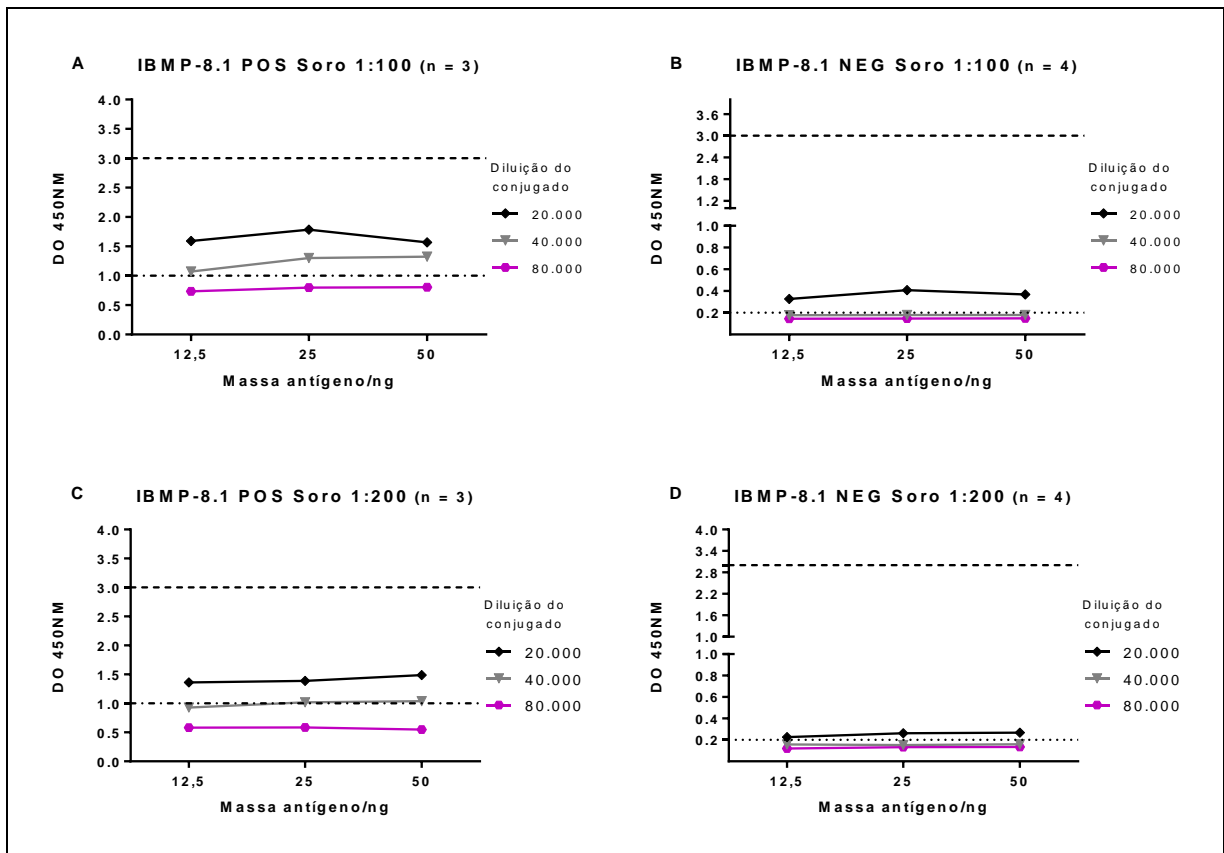


**Fonte:** O autor.

**Nota:** Amostras séricas diluídas 25 (A e B), 50 (C e D), 100 (E e F) e 200 vezes (G e H). A linha tracejada representa o limite máximo de detecção do equipamento. Linha com traço e ponto representa o limite mínimo inferior requerido para o conjunto de amostras positivas. Linha pontilhada representa o limite máximo exigido para o conjunto de amostras negativas.

**Legenda:** DO (densidade óptica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

**Figura 15** - Análise gráfica dos valores médios de absorbância do PRP-IBMP-8.1 com diluição sérica de 100 e 200 vezes



**Fonte:** O autor.

**Nota:** Amostras séricas diluídas 100 (A e B) e 200 vezes (C e D). O conjugado foi avaliado nas diluições de 20.000, 40.000 e 80.000 vezes. A linha tracejada representa o limite máximo de detecção do equipamento. Linha com traço e ponto representa o limite mínimo inferior requerido para o conjunto de amostras positivas. Linha pontilhada representa o limite máximo exigido para o conjunto de amostras negativas.

**Legenda:** DO (densidade óptica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

Conforme destacado em vermelho na Tabela 3, a maior diferença encontrada entre a média aritmética do sinal (DO) das amostras positivas e a média aritmética do sinal das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi encontrada ao utilizar 25 ng do PRP-IBMP-8.1 por cavidade somada à diluição sérica de 100 vezes e do conjugado de 40.000.

**Tabela 3** - Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao PRP-IBMP-8.1

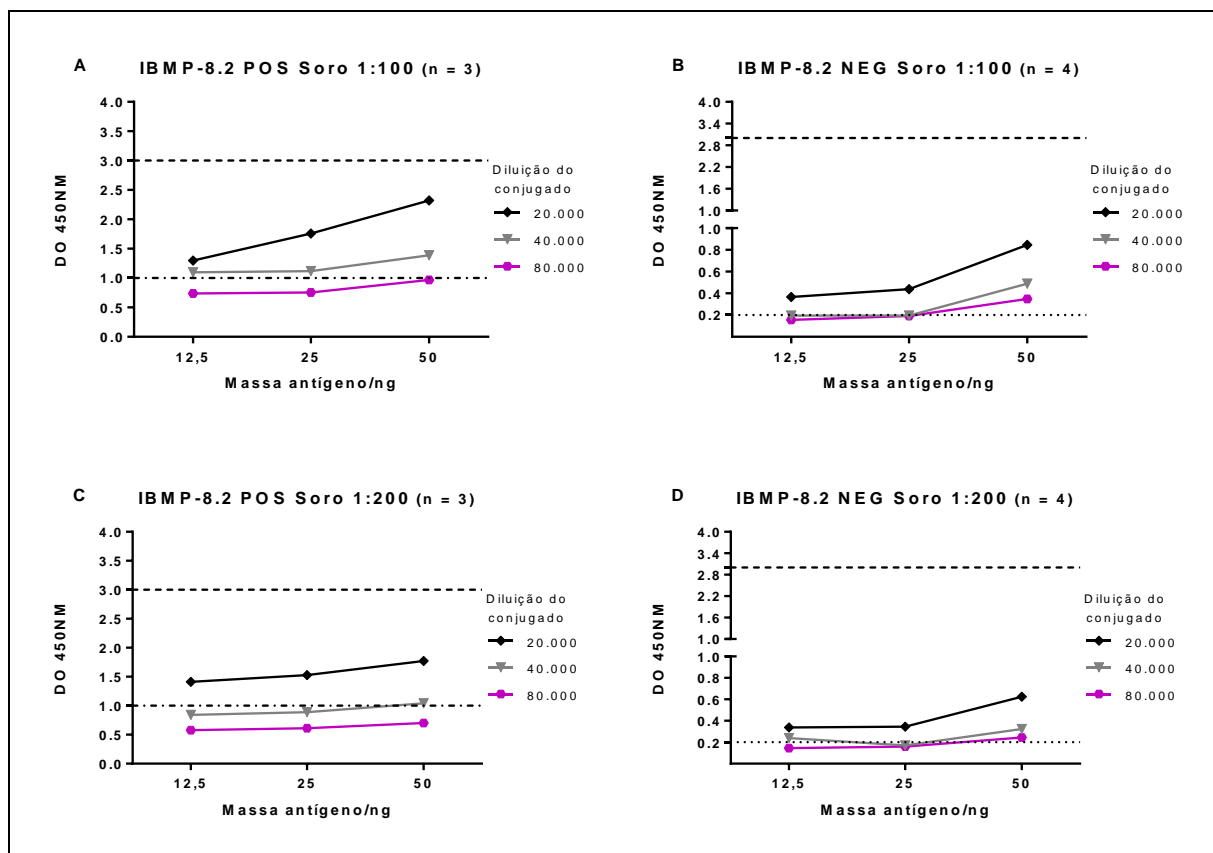
| Conjugado | PRP IBMP | Soro  | $\bar{X}$ DO NEG | $\sigma$ | $\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ | $\bar{X}$ DO POS | $(\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ ) - $\bar{X}$ DO POS) |
|-----------|----------|-------|------------------|----------|-------------------------------|------------------|--|
| 1:20.000  | 50 ng    | 1:100 | 0,369            | 0,060    | 0,550                         | 1,568            | 1,018  |
|           |          | 1:200 | 0,267            | 0,095    | 0,551                         | 1,487            | 0,936  |
|           | 25 ng    | 1:100 | 0,408            | 0,280    | 1,247                         | 1,784            | 0,536  |
|           |          | 1:200 | 0,263            | 0,041    | 0,387                         | 1,389            | 1,002  |
|           | 12,5 ng  | 1:100 | 0,327            | 0,091    | 0,600                         | 1,592            | 0,992  |
|           |          | 1:200 | 0,226            | 0,049    | 0,371                         | 1,360            | 0,988  |
| 1:40.000  | 50 ng    | 1:100 | 0,180            | 0,044    | 0,313                         | 1,325            | 1,012  |
|           |          | 1:200 | 0,159            | 0,045    | 0,296                         | 1,040            | 0,744  |
|           | 25 ng    | 1:100 | 0,179            | 0,034    | 0,280                         | 1,302            | <b>1,022</b>   |
|           |          | 1:200 | 0,153            | 0,023    | 0,223                         | 1,017            | 0,794  |
|           | 12,5 ng  | 1:100 | 0,178            | 0,028    | 0,263                         | 1,073            | 0,810  |
|           |          | 1:200 | 0,158            | 0,015    | 0,202                         | 0,927            | 0,724  |
| 1:80.000  | 50 ng    | 1:100 | 0,149            | 0,031    | 0,243                         | 0,806            | 0,564  |
|           |          | 1:200 | 0,134            | 0,031    | 0,227                         | 0,548            | 0,322  |
|           | 25 ng    | 1:100 | 0,146            | 0,024    | 0,218                         | 0,798            | 0,580  |
|           |          | 1:200 | 0,133            | 0,025    | 0,208                         | 0,585            | 0,377  |
|           | 12,5 ng  | 1:100 | 0,145            | 0,009    | 0,173                         | 0,734            | 0,561  |
|           |          | 1:200 | 0,120            | 0,021    | 0,183                         | 0,583            | 0,400  |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\bar{X}$  (média aritmética);  $\sigma$  (desvio padrão); DO (densidade ótica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

O PRP-IBMP-8.2 foi avaliado nas quantidades de 50, 25 e 12,5 ng por cavidade e amostras séricas diluídas 100 (Figuras 16A e 16B) e 200 vezes (Figuras 16C e 16D). O conjugado foi usado quando diluído 20.000, 40.000 e 80.000 vezes. A análise da DO demonstrou que a maior diferença observada entre a média aritmética do sinal das amostras positivas e a média aritmética do sinal das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi conseguida utilizando 12,5 ng do antígeno, aliada à diluição sérica de 100 vezes e do anticorpo secundário de 40.000, conforme destacado em vermelho na Tabela 4.

**Figura 16** - Análise gráfica dos valores médios de absorbância do PRP-IBMP-8.2 com diluição sérica de 100 e 200 vezes



**Fonte:** O autor.

**Nota:** Amostras séricas diluídas 100 (A e B) e 200 vezes (C e D). O conjugado foi avaliado nas diluições de 20.000, 40.000 e 80.000 vezes. A linha tracejada representa o limite máximo de detecção do equipamento. Linha com traço e ponto representa o limite mínimo inferior requerido para o conjunto de amostras positivas. Linha pontilhada representa o limite máximo exigido para o conjunto de amostras negativas.

**Legenda:** DO (densidade óptica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).



**Tabela 4** - Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao PRP-IBMP-8.2

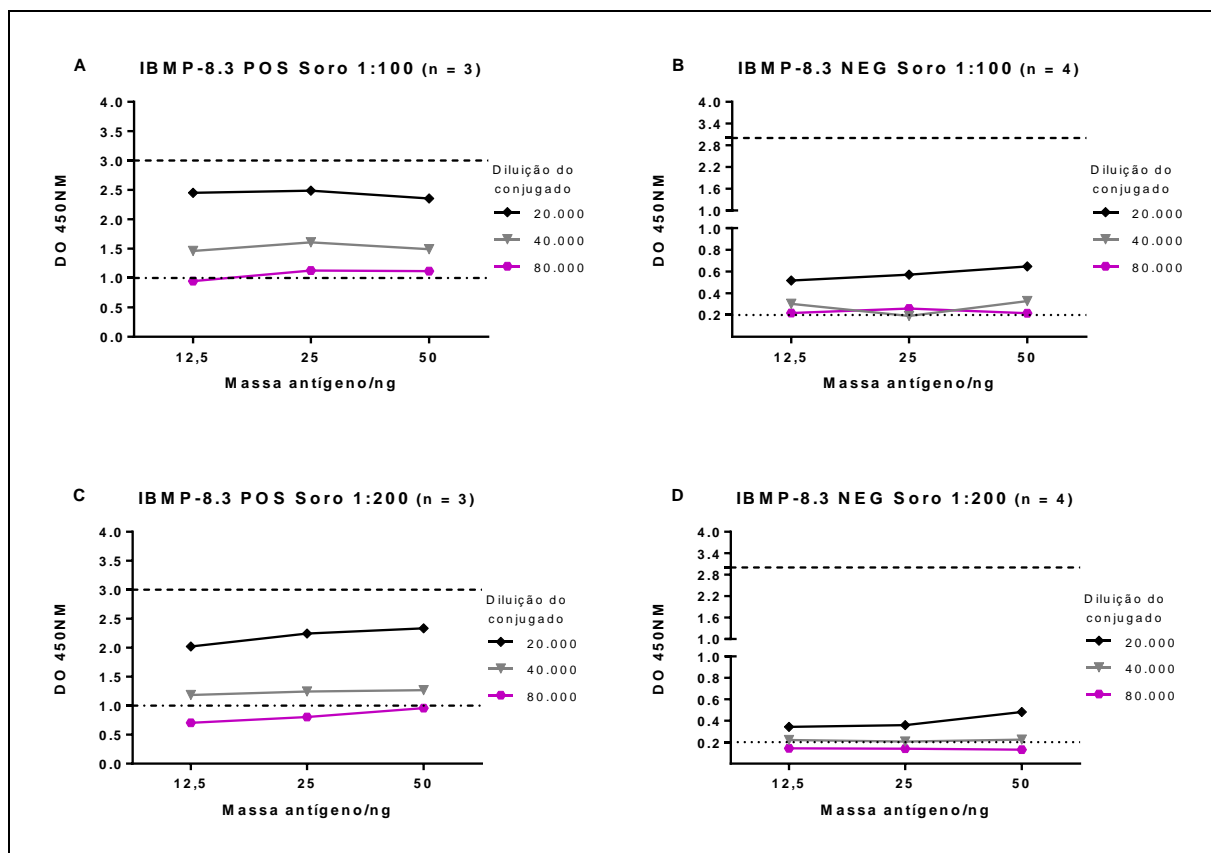
| Conjugado | PRP IBMP | Soro  | $\bar{X}$ DO NEG | $\sigma$ | $\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ | $\bar{X}$ DO POS | $(\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ ) - $(\bar{X}$ DO POS) |
|-----------|----------|-------|------------------|----------|-------------------------------|------------------|---|
| 1:20.000  | 50 ng    | 1:100 | 0,846            | 0,329    | 1,835                         | 2,322            | 0,487   |
|           |          | 1:200 | 0,624            | 0,318    | 1,579                         | 1,772            | 0,193   |
|           | 25 ng    | 1:100 | 0,439            | 0,157    | 0,910                         | 1,758            | 0,848   |
|           |          | 1:200 | 0,345            | 0,253    | 1,105                         | 1,529            | 0,424   |
|           | 12,5 ng  | 1:100 | 0,366            | 0,064    | 0,558                         | 1,297            | 0,739   |
|           |          | 1:200 | 0,337            | 0,127    | 0,718                         | 1,412            | 0,694   |
| 1:40.000  | 50 ng    | 1:100 | 0,489            | 0,197    | 1,080                         | 1,388            | 0,308   |
|           |          | 1:200 | 0,324            | 0,110    | 0,654                         | 1,043            | 0,389   |
|           | 25 ng    | 1:100 | 0,196            | 0,042    | 0,324                         | 1,118            | 0,795   |
|           |          | 1:200 | 0,171            | 0,024    | 0,243                         | 0,890            | 0,647   |
|           | 12,5 ng  | 1:100 | 0,196            | 0,027    | 0,276                         | 1,097            | <b>0,821</b>  |
|           |          | 1:200 | 0,239            | 0,094    | 0,521                         | 0,841            | 0,320   |
| 1:80.000  | 50 ng    | 1:100 | 0,348            | 0,124    | 0,719                         | 0,968            | 0,248   |
|           |          | 1:200 | 0,244            | 0,067    | 0,445                         | 0,702            | 0,256   |
|           | 25 ng    | 1:100 | 0,191            | 0,097    | 0,483                         | 0,755            | 0,273   |
|           |          | 1:200 | 0,160            | 0,063    | 0,349                         | 0,613            | 0,264   |
|           | 12,5 ng  | 1:100 | 0,156            | 0,008    | 0,179                         | 0,738            | 0,559   |
|           |          | 1:200 | 0,145            | 0,026    | 0,223                         | 0,580            | 0,357   |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\bar{X}$  (média aritmética);  $\sigma$  (desvio padrão); DO (densidade ótica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

O PRP-IBMP-8.3 foi avaliado nas quantidades de 50, 25 e 12,5 ng por cavidade e diluições séricas de 1:100 (Figuras 17A e 17B) e 1:200 (Figuras 17C e 17D). O conjugado foi usado quando diluído 20.000, 40.000 e 80.000 vezes. A maior diferença observada entre a média aritmética das DO das amostras positivas e a média aritmética das DO das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi de 1,335, como destacado em vermelho na Tabela 5.

**Figura 17** - Análise gráfica dos valores médios de absorbância do PRP-IBMP-8.3 com diluição sérica de 100 e 200 vezes



**Fonte:** O autor.

**Nota:** Amostras séricas diluídas 1:100 (A e B) e 1:200 (C e D). O conjugado foi avaliado nas diluições de 20.000, 40.000 e 80.000 vezes. A linha tracejada representa o limite máximo de detecção do equipamento. Linha com traço e ponto representa o limite mínimo inferior requerido para o conjunto de amostras positivas. Linha pontilhada representa o limite máximo exigido para o conjunto de amostras negativas.

**Legenda:** DO (densidade óptica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

**Tabela 5** - Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao PRP-IBMP-8.3

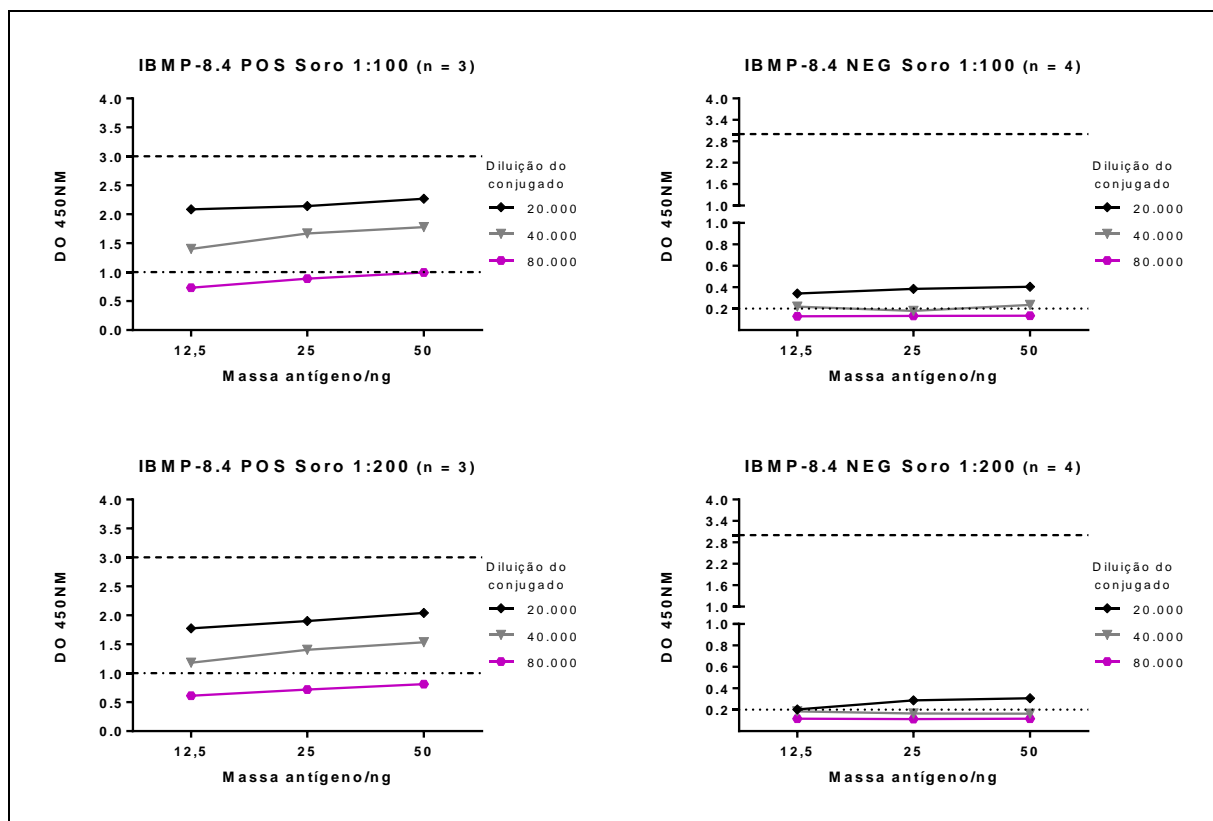
| Conjugado       | PRP IBMP | Soro  | $\bar{X}$ DO NEG | $\sigma$ | $\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ | $\bar{X}$ DO POS | $(\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ ) - $(\bar{X}$ DO POS) |
|-----------------|----------|-------|------------------|----------|-------------------------------|------------------|---|
| <b>1:20.000</b> | 50 ng    | 1:100 | 0,647            | 0,304    | 1,560                         | 2,356            | 0,797   |
|                 |          | 1:200 | 0,482            | 0,299    | 1,378                         | 2,334            | 0,956   |
|                 | 25 ng    | 1:100 | 0,572            | 0,254    | 1,334                         | 2,488            | 1,154   |
|                 |          | 1:200 | 0,359            | 0,241    | 1,083                         | 2,244            | 1,161   |
|                 | 12,5 ng  | 1:100 | 0,518            | 0,223    | 1,186                         | 2,453            | 1,268   |
|                 |          | 1:200 | 0,343            | 0,246    | 1,082                         | 2,023            | 0,941   |
| <b>1:40.000</b> | 50 ng    | 1:100 | 0,328            | 0,131    | 0,722                         | 1,490            | 0,768   |
|                 |          | 1:200 | 0,224            | 0,106    | 0,543                         | 1,269            | 0,726   |
|                 | 25 ng    | 1:100 | 0,192            | 0,026    | 0,271                         | 1,607            | <b>1,335</b>  |
|                 |          | 1:200 | 0,206            | 0,108    | 0,531                         | 1,246            | 0,715   |
|                 | 12,5 ng  | 1:100 | 0,303            | 0,141    | 0,725                         | 1,461            | 0,736   |
|                 |          | 1:200 | 0,221            | 0,069    | 0,428                         | 1,184            | 0,756   |
| <b>1:80.000</b> | 50 ng    | 1:100 | 0,218            | 0,092    | 0,493                         | 1,119            | 0,626   |
|                 |          | 1:200 | 0,131            | 0,015    | 0,175                         | 0,958            | 0,783   |
|                 | 25 ng    | 1:100 | 0,261            | 0,186    | 0,820                         | 1,129            | 0,309   |
|                 |          | 1:200 | 0,140            | 0,038    | 0,254                         | 0,806            | 0,552   |
|                 | 12,5 ng  | 1:100 | 0,219            | 0,127    | 0,601                         | 0,947            | 0,346   |
|                 |          | 1:200 | 0,144            | 0,034    | 0,246                         | 0,704            | 0,458   |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\bar{X}$  (média aritmética);  $\sigma$  (desvio padrão); DO (densidade ótica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

A otimização dos componentes do ELISA para o PRP-IBMP-8.4 foi realizada utilizando o antígeno nas quantidades de 50, 25 e 12,5 ng por cavidade e amostras séricas diluídas 100 (Figuras 18A e 18B) e 200 vezes (Figuras 18C e 18D). Conforme destacado em vermelho na Tabela 6, a maior diferença encontrada entre a média aritmética da DO das amostras positivas e a média aritmética da DO das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi de 1,414 ao utilizar 25 ng do PRP-IBMP-8.4 somada à diluição sérica de 1:100 e do anticorpo secundário 1:40.000.

**Figura 18** - Análise gráfica dos valores médios de absorbância do PRP-IBMP-8.4 com diluição sérica de 100 e 200 vezes



**Fonte:** O autor.

**Nota:** Amostras séricas diluídas 1:100 (A e B) e 1:200 (C e D). O conjugado foi avaliado nas diluições de 20.000, 40.000 e 80.000 vezes. A linha tracejada representa o limite máximo de detecção do equipamento. Linha com traço e ponto representa o limite mínimo inferior requerido para o conjunto de amostras positivas. Linha pontilhada representa o limite máximo exigido para o conjunto de amostras negativas.

**Legenda:** DO (densidade óptica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

**Tabela 6** - Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao PRP-IBMP-8.4

| Conjugado | PRP IBMP | Soro  | $\bar{X}$ DO NEG | $\sigma$ | $\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ | $\bar{X}$ DO POS | $(\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ ) - $(\bar{X}$ DO POS) |
|-----------|----------|-------|------------------|----------|-------------------------------|------------------|---|
| 1:20.000  | 50 ng    | 1:100 | 0,405            | 0,159    | 0,883                         | 2,267            | 1,383   |
|           |          | 1:200 | 0,307            | 0,168    | 0,810                         | 2,042            | 1,232   |
|           | 25 ng    | 1:100 | 0,384            | 0,141    | 0,808                         | 2,141            | 1,333   |
|           |          | 1:200 | 0,288            | 0,180    | 0,829                         | 1,903            | 1,074   |
|           | 12,5 ng  | 1:100 | 0,342            | 0,148    | 0,787                         | 2,086            | 1,300   |
|           |          | 1:200 | 0,203            | 0,069    | 0,412                         | 1,776            | 1,364   |
| 1:40.000  | 50 ng    | 1:100 | 0,236            | 0,049    | 0,384                         | 1,779            | 1,394   |
|           |          | 1:200 | 0,163            | 0,016    | 0,211                         | 1,536            | 1,325   |
|           | 25 ng    | 1:100 | 0,179            | 0,024    | 0,252                         | 1,667            | <b>1,414</b>  |
|           |          | 1:200 | 0,165            | 0,016    | 0,213                         | 1,404            | 1,191   |
|           | 12,5 ng  | 1:100 | 0,219            | 0,060    | 0,398                         | 1,402            | 1,003   |
|           |          | 1:200 | 0,184            | 0,039    | 0,299                         | 1,183            | 0,884   |
| 1:80.000  | 50 ng    | 1:100 | 0,134            | 0,008    | 0,160                         | 0,995            | 0,836   |
|           |          | 1:200 | 0,117            | 0,006    | 0,134                         | 0,813            | 0,679   |
|           | 25 ng    | 1:100 | 0,133            | 0,006    | 0,152                         | 0,889            | 0,737   |
|           |          | 1:200 | 0,113            | 0,006    | 0,130                         | 0,718            | 0,588   |
|           | 12,5 ng  | 1:100 | 0,128            | 0,007    | 0,149                         | 0,730            | 0,581   |
|           |          | 1:200 | 0,117            | 0,008    | 0,140                         | 0,610            | 0,469   |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\bar{X}$  (média aritmética);  $\sigma$  (desvio padrão); DO (densidade ótica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

### 7.3.3 Avaliação do SFB e do BSA como agentes bloqueadores

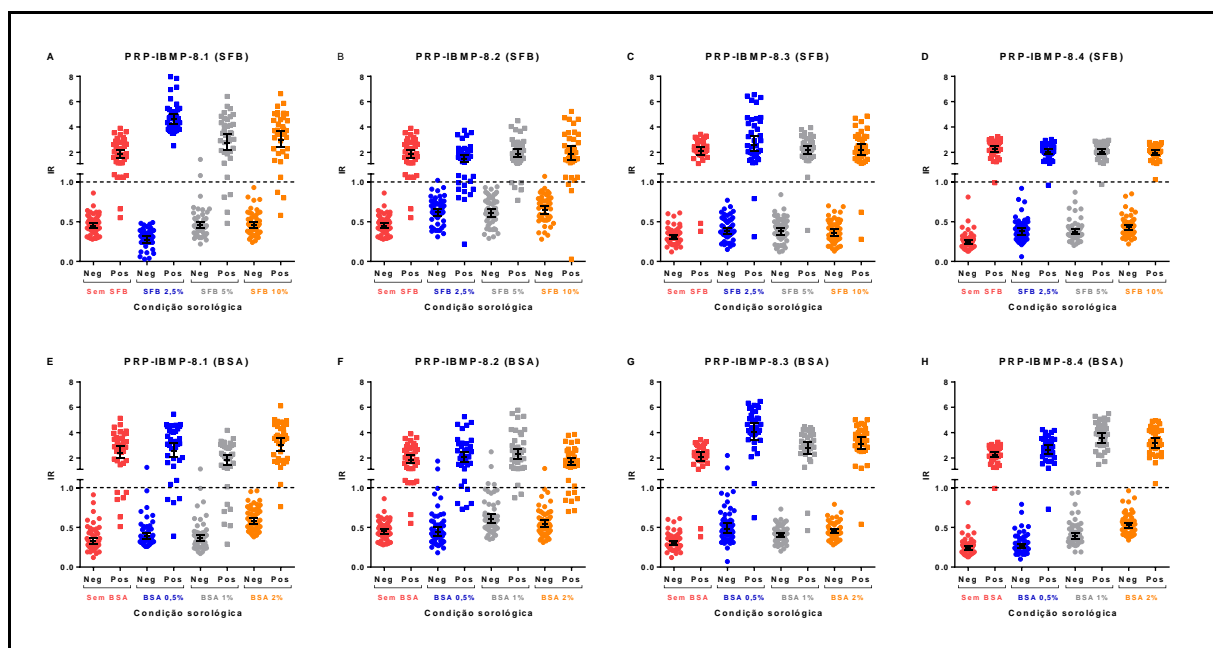
A adição de SFB ou BSA ao tampão de diluição de amostras (PBS-T) revelou valores variados dos IR médios para as amostras positivas e negativas quando comparados a não adição dos mesmos. Tais resultados encontram-se descritos na Tabela 7 e apresentados na Figura 19.

Tabela 7 - Índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando SFB e BSA

| PRP<br>IBMP                | Agente<br>bloqueador       | AMOSRAS POSITIVAS |           |           |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |           |      |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|-----------|-----------|------|--------------------|-----------|-----------|------|
|                            |                            | IR                | IC95%     | $\sigma$  | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$  | CV   |
| 8.1                        | SFB 2,5%                   | 4,64              | 4,27-5,04 | 1,28      | 0,28 | 0,27               | 0,23-0,32 | 1,79      | 6,62 |
|                            | SFB 5%                     | 2,74              | 2,19-3,43 | 1,94      | 0,71 | 0,45               | 0,42-0,50 | 1,38      | 3,04 |
|                            | SFB 10%                    | 2,97              | 2,41-3,66 | 1,85      | 0,62 | 0,46               | 0,42-0,49 | 1,34      | 2,94 |
|                            | <b>SEM SFB<br/>SEM BSA</b> | 2,40              | 1,96-2,94 | 1,82      | 0,76 | 0,32               | 0,29-0,36 | 1,49      | 4,60 |
|                            | BSA 0,5%                   | 2,56              | 2,07-3,17 | 1,88      | 0,74 | 0,39               | 0,36-0,43 | 1,39      | 3,56 |
|                            | BSA 1%                     | 1,81              | 1,46-2,24 | 1,88      | 1,04 | 0,37               | 0,33-0,41 | 1,48      | 4,02 |
|                            | BSA 2%                     | 2,99              | 2,52-3,55 | 1,66      | 0,55 | 0,58               | 0,54-0,62 | 1,28      | 2,20 |
|                            | 8.2                        | SFB 2,5%          | 1,50      | 1,24-1,82 | 1,77 | 1,18               | 0,62      | 0,57-0,66 | 1,31 |
| SFB 5%                     |                            | 1,89              | 1,61-2,22 | 1,61      | 0,85 | 0,61               | 0,56-0,66 | 1,34      | 2,20 |
| SFB 10%                    |                            | 1,84              | 1,37-2,47 | 2,40      | 1,31 | 0,64               | 0,60-0,69 | 1,32      | 2,05 |
| <b>SEM SFB<br/>SEM BSA</b> |                            | 1,84              | 1,55-2,18 | 1,66      | 0,90 | 0,45               | 0,42-0,49 | 1,29      | 2,84 |
| BSA 0,5%                   |                            | 2,05              | 1,69-2,48 | 1,76      | 0,86 | 0,45               | 0,40-0,50 | 1,53      | 3,42 |
| BSA 1%                     |                            | 2,28              | 1,89-2,75 | 1,74      | 0,77 | 0,61               | 0,55-0,67 | 1,43      | 2,34 |
| BSA 2%                     |                            | 1,66              | 1,41-1,96 | 1,63      | 0,98 | 0,54               | 0,50-0,59 | 1,33      | 2,45 |
| 8.3                        |                            | SFB 2,5%          | 2,61      | 2,08-3,28 | 1,95 | 0,75               | 0,39      | 0,35-0,43 | 1,44 |
|                            | SFB 5%                     | 2,16              | 1,86-2,51 | 1,56      | 0,72 | 0,38               | 0,33-0,42 | 1,55      | 4,11 |
|                            | SFB 10%                    | 2,15              | 1,77-2,62 | 1,79      | 0,83 | 0,36               | 0,32-0,40 | 1,50      | 4,14 |
|                            | <b>SEM SFB<br/>SEM BSA</b> | 2,09              | 1,78-2,45 | 1,60      | 0,76 | 0,30               | 0,28-0,33 | 1,39      | 4,55 |
|                            | BSA 0,5%                   | 4,04              | 3,43-4,75 | 1,62      | 0,40 | 0,48               | 0,43-0,55 | 1,61      | 3,32 |
|                            | BSA 1%                     | 2,75              | 2,34-3,24 | 1,62      | 0,59 | 0,40               | 0,37-0,43 | 1,31      | 3,26 |
|                            | BSA 2%                     | 3,14              | 2,69-3,66 | 1,58      | 0,50 | 0,45               | 0,42-0,48 | 1,24      | 2,76 |
|                            | 8.4                        | SFB 2,5%          | 2,03      | 1,84-2,25 | 1,34 | 0,66               | 0,38      | 0,34-0,42 | 1,50 |
| SFB 5%                     |                            | 2,05              | 1,86-2,25 | 1,32      | 0,65 | 0,37               | 0,34-0,40 | 1,35      | 3,62 |
| SFB 10%                    |                            | 1,97              | 1,79-2,16 | 1,32      | 0,67 | 0,43               | 0,40-0,46 | 1,31      | 3,07 |
| <b>SEM SFB<br/>SEM BSA</b> |                            | 2,27              | 2,06-2,50 | 1,34      | 0,59 | 0,24               | 0,22-0,27 | 1,40      | 5,79 |
| BSA 0,5%                   |                            | 2,64              | 2,31-3,00 | 1,47      | 0,56 | 0,26               | 0,24-0,29 | 1,50      | 5,69 |
| BSA 1%                     |                            | 3,57              | 3,21-3,98 | 1,37      | 0,38 | 0,39               | 0,35-0,43 | 1,40      | 3,61 |
| BSA 2%                     |                            | 3,16              | 2,81-3,56 | 1,41      | 0,45 | 0,52               | 0,49-0,56 | 1,26      | 2,41 |

Fonte: O autor.

Legenda:  $\sigma$  (desvio padrão); BSA (albumina sérica bovina); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade); SFB (soro fetal bovino).

**Figura 19** – Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando SFB e BSA

**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1 (SFB); (B) PRP-IBMP-8.2 (SFB); (C) PRP-IBMP-8.3 (SFB); (D) PRP-IBMP-8.4 (SFB); (E) PRP-IBMP-8.1 (BSA); (F) PRP-IBMP-8.2 (BSA); (G) PRP-IBMP-8.3 (BSA); (H) PRP-IBMP-8.4 (BSA). Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas. POS (n = 36); NEG (n = 54).

**Legenda:** BSA (albumina sérica bovina); IR (índice de reatividade); Neg (amostras negativas); Pos (amostras positivas); SFB (soro fetal bovino).

Os parâmetros de desempenho determinados para os casos de adição de SFB e BSA aos PRP-IBMP encontram-se sumarizados na Tabela 8. Além disso, são também mostrados os dados referentes à utilização do tampão de amostra sem acréscimo dos agentes bloqueadores.

Tabela 8 – Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP utilizando SFB e BSA

| PRP<br>IBMP | Agente<br>bloqueador | AUC<br>(IC95%)   | Sen (%)<br>(IC95%) | Esp (%)<br>(IC95%) | Exa (%)<br>(IC95%) | J<br>(%) |
|-------------|----------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|
| 8.1         | SFB 2,5%             | 1,00             | 100 (90,4-100)     | 100 (93,4-100)     | 100 (95,9-100)     | 100      |
|             | SFB 5%               | 0,99 (0,97-1,00) | 88,9 (74,7-95,6)   | 96,3 (87,5-99,0)   | 93,3 (86,2-96,9)   | 85,2     |
|             | SFB 10%              | 0,99 (0,97-1,00) | 91,7 (78,2-97,1)   | 100 (93,4-100)     | 96,7 (90,7-98,9)   | 91,7     |
|             | SEM SFB<br>SEM BSA   | 0,99 (0,99-1,00) | 94,4 (81,9-98,5)   | 100 (93,4-100)     | 97,8 (92,3-99,4)   | 94,4     |
|             | BSA 0,5%             | 0,99 (0,97-1,00) | 88,9 (74,7-95,6)   | 98,1 (90,2-99,7)   | 94,4 (87,6-97,6)   | 87,0     |
|             | BSA 1%               | 0,97 (0,92-1,00) | 83,3 (68,1-92,1)   | 98,1 (90,2-99,7)   | 92,2 (84,8-96,2)   | 81,5     |
|             | BSA 2%               | 0,99 (0,99-1,00) | 97,2 (85,8-99,5)   | 100 (93,4-100)     | 98,9 (94,0-99,8)   | 97,2     |
| 8.2         | SFB 2,5%             | 0,96 (0,90-1,00) | 75,0 (58,9-86,2)   | 98,1 (90,2-99,7)   | 88,9 (80,7-93,9)   | 73,1     |
|             | SFB 5%               | 0,99 (0,98-1,00) | 86,1 (71,3-93,9)   | 100 (93,4-100)     | 94,4 (87,6-97,6)   | 86,1     |
|             | SFB 10%              | 0,97 (0,91-1,00) | 91,7 (78,2-97,1)   | 98,1 (90,2-99,7)   | 95,6 (89,1-98,3)   | 89,8     |
|             | SEM SFB<br>SEM BSA   | 0,99 (0,98-1,00) | 97,1 (85,5-99,5)   | 100 (93,4-100)     | 98,9 (93,9-99,8)   | 97,1     |
|             | BSA 0,5%             | 0,98 (0,96-1,00) | 86,1 (71,3-93,9)   | 96,3 (87,5-99,0)   | 92,2 (84,8-96,2)   | 82,4     |
|             | BSA 1%               | 0,98 (0,95-1,00) | 94,4 (81,9-98,5)   | 92,6 (82,4-97,1)   | 93,3 (86,2-96,9)   | 87,0     |
|             | BSA 2%               | 0,98 (0,96-1,00) | 80,6 (65,0-90,2)   | 98,1 (90,2-99,7)   | 91,1 (83,4-95,4)   | 78,7     |
| 8.3         | SFB 2,5%             | 0,98 (0,94-1,00) | 94,4 (81,9-98,5)   | 100 (93,4-100)     | 97,8 (92,3-99,4)   | 94,4     |
|             | SFB 5%               | 0,98 (0,95-1,00) | 94,4 (81,9-98,5)   | 100 (93,4-100)     | 97,8 (92,3-99,4)   | 94,4     |
|             | SFB 10%              | 0,98 (0,94-1,00) | 94,4 (81,9-98,5)   | 100 (93,4-100)     | 97,8 (92,3-99,4)   | 94,4     |
|             | SEM SFB<br>SEM BSA   | 0,99 (0,98-1,00) | 97,2 (85,8-99,5)   | 100 (93,4-100)     | 98,9 (94,0-99,8)   | 97,2     |
|             | BSA 0,5%             | 0,99 (0,98-1,00) | 97,2 (85,8-99,5)   | 96,3 (87,5-99,0)   | 96,7 (90,7-98,9)   | 93,5     |
|             | BSA 1%               | 0,99 (0,97-1,00) | 94,4 (81,9-98,5)   | 100 (93,4-100)     | 97,8 (92,3-99,4)   | 94,4     |
|             | BSA 2%               | 0,99 (0,98-1,00) | 97,2 (85,8-99,5)   | 100 (93,4-100)     | 98,9 (94,0-99,8)   | 97,2     |
| 8.4         | SFB 2,5%             | 0,99 (0,99-1,00) | 97,2 (85,8-99,5)   | 100 (90,4-100)     | 98,9 (94,0-99,8)   | 97,2     |
|             | SFB 5%               | 0,99 (0,99-1,00) | 97,2 (85,8-99,5)   | 100 (90,4-100)     | 98,9 (94,0-99,8)   | 97,2     |
|             | SFB 10%              | 1,00             | 100 (90,4-100)     | 100 (93,4-100)     | 100 (95,9-100)     | 100      |
|             | SEM SFB<br>SEM BSA   | 1,00             | 100 (90,4-100)     | 100 (93,4-100)     | 100 (95,9-100)     | 100      |
|             | BSA 0,5%             | 0,99 (0,99-1,00) | 97,2 (85,8-99,5)   | 100 (90,4-100)     | 98,9 (94,0-99,8)   | 97,2     |
|             | BSA 1%               | 1,00             | 100 (90,4-100)     | 100 (93,4-100)     | 100 (95,9-100)     | 100      |
|             | BSA 2%               | 1,00             | 100 (90,4-100)     | 100 (93,4-100)     | 100 (95,9-100)     | 100      |

Fonte: O autor.

Legenda: AUC (área abaixo da curva); BSA (albumina sérica bovina); Esp (especificidade); Exa (exatidão); IC (intervalo de confiança); J (índice de Youden); Sen (sensibilidade); SFB (soro fetal bovino).

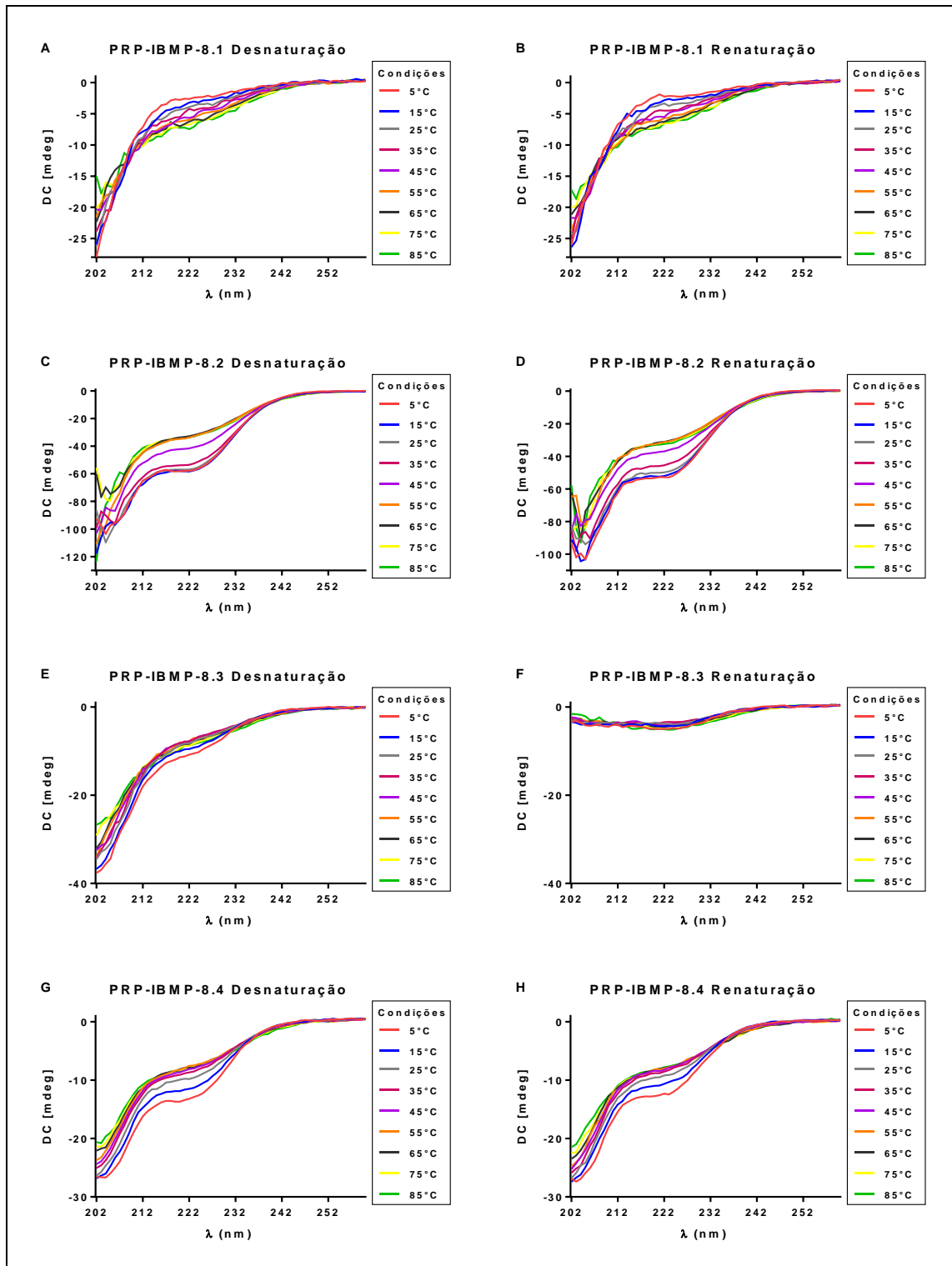
## 7.4 Avaliação da estabilidade estrutural e funcional dos PRP-IBMP

### 7.4.1 Estabilidade a temperaturas extremas

A Figura 20 mostra os espectros de desnaturação e renaturação para os PRP-IBMP.



**Figura 20** – Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular obtidos da avaliação de estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas



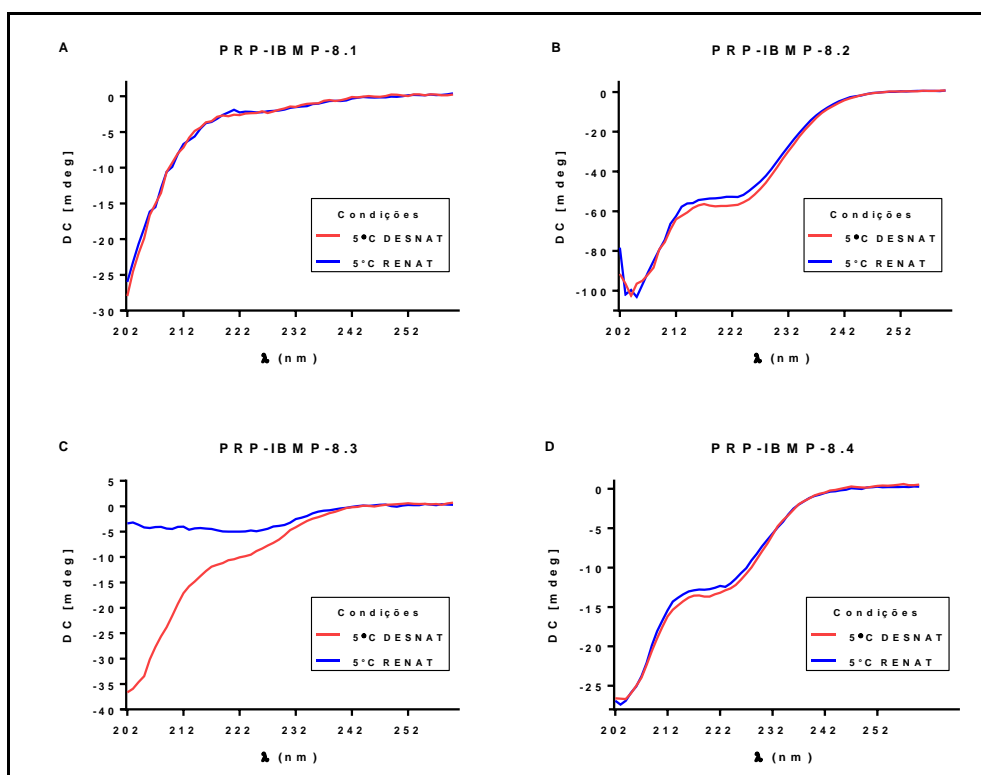
**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1 desnaturação; (B) PRP-IBMP-8.1 renaturação; (C) PRP-IBMP-8.2 desnaturação; (D) PRP-IBMP-8.2 renaturação; (E) PRP-IBMP-8.3 desnaturação; (F) PRP-IBMP-8.3 renaturação; (G) PRP-IBMP-8.4 desnaturação; (H) PRP-IBMP-8.4 renaturação.

**Legenda:** DC (dicroísmo circular).

O ensaio para verificação de reversibilidade da desnaturação, realizado utilizando a temperatura de 5°C no início e ao final do ensaio a 202 nm, mostrou que 92,3%, 85,5% e 98,8% do PRP-IBMP-8.1 (Figura 21A), 8.2 (Figura 21B) e 8.4 (Figura 21D), respectivamente, retornaram ao seu estado inicial de conformação. Para o PRP-IBMP-8.3, somente 9,2% retornou à sua conformação inicial, ficando 90,8% na forma precipitada (Figura 21C).

**Figura 21** - Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular obtidos da avaliação de reversibilidade da desnaturação dos PRP-IBMP a temperaturas extremas

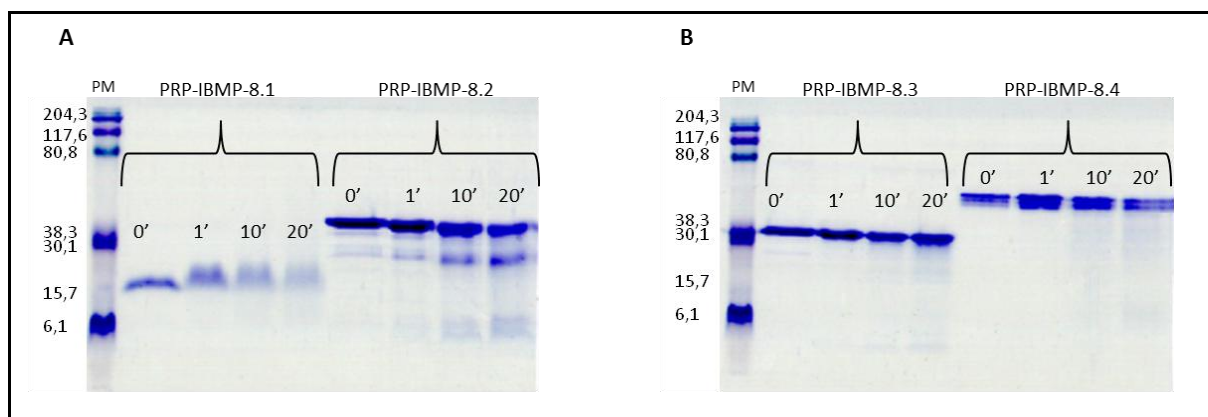


**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3; (D) PRP-IBMP-8.4.

**Legenda:** DC (dicroísmo circular); Desnat (desnaturação); Renat (renaturação).

A Figura 22 mostra o perfil proteico dos PRP-IBMP após submissão a temperaturas extremas.

**Figura 22** - Perfil de bandas obtido da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas

**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1 e 8.2; (B) PRP-IBMP-8.3 e 8.4. Em cada poço foi depositado 1 µg do antígenos. SDS-PAGE corados pelo azul de Coomassie R250.

**Legenda:** PM = peso molecular em quilodaltons (kDa) (aprotinina – 6,1; lisozima – 15,7; inibidor de tripsina da soja – 30,1; anidrase carbônica – 38,3; BSA – 80,8; β-galactosidase – 117,6; miosina – 204,3).

Os valores médios dos IR gerados a partir da análise funcional encontram-se descritos na Tabela 9 e as análises gráficas na Figura 23.

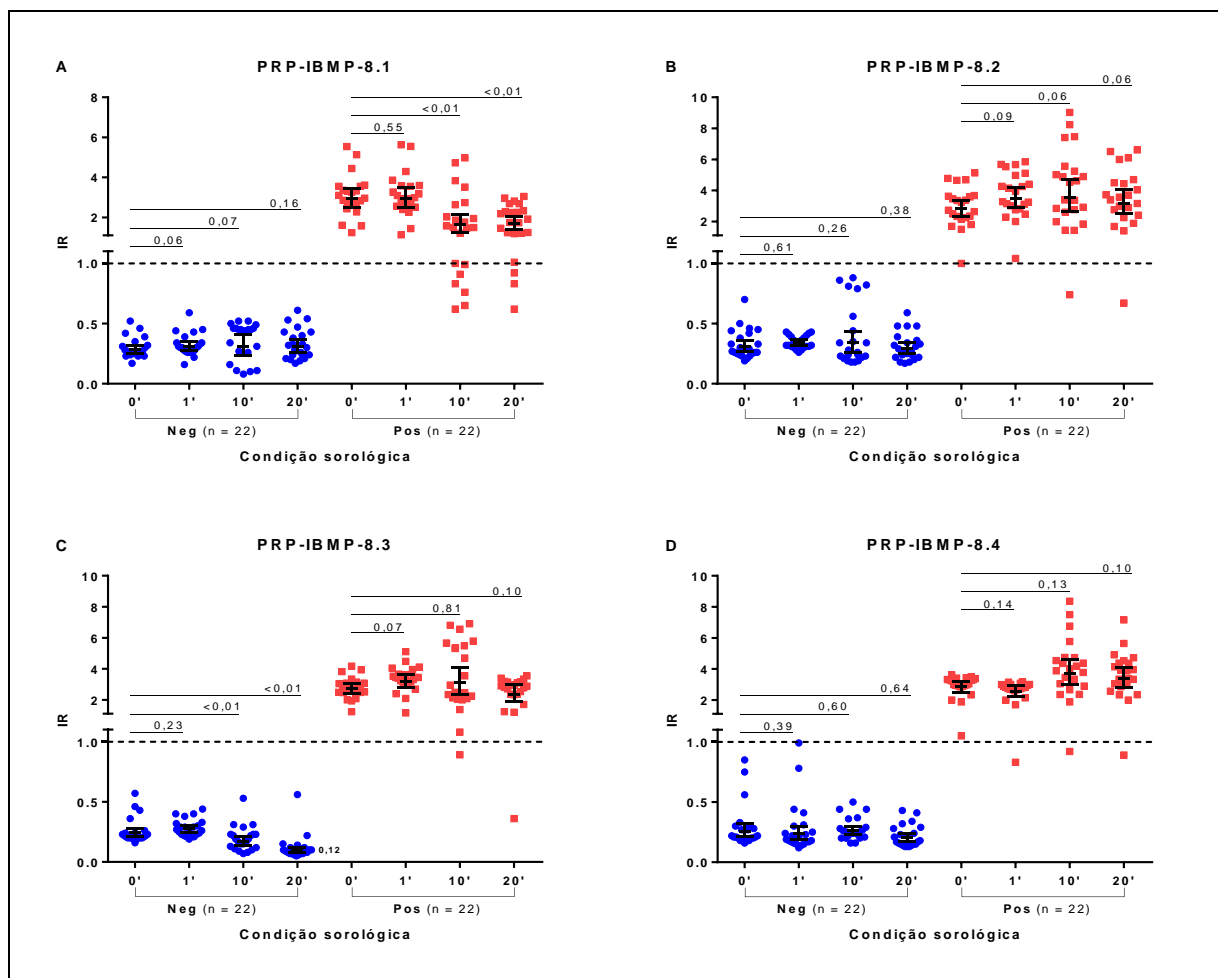
**Tabela 9** – Índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas

| PRP IBMP | Condição de estresse | AMOSTRAS POSITIVAS |           |          |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |          |       |
|----------|----------------------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|-------|
|          |                      | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV    |
| 8.1      | Nativa               | 2,93               | 2,50-3,43 | 1,43     | 0,49 | 0,29               | 0,26-0,32 | 1,30     | 4,53  |
|          | 1 minuto             | 2,96               | 2,52-3,47 | 1,44     | 0,49 | 0,31               | 0,28-0,35 | 1,32     | 4,23  |
|          | 10 minutos           | 1,62               | 1,23-2,13 | 1,86     | 1,15 | 0,31               | 0,24-0,41 | 1,84     | 5,96  |
|          | 20 minutos           | 1,69               | 1,38-2,06 | 1,58     | 0,94 | 0,31               | 0,26-0,37 | 1,44     | 4,64  |
| 8.2      | Nativa               | 2,80               | 2,33-3,36 | 1,51     | 0,54 | 0,31               | 0,27-0,36 | 1,39     | 4,46  |
|          | 1 minuto             | 3,51               | 2,92-4,22 | 1,52     | 0,43 | 0,34               | 0,32-0,37 | 1,16     | 3,39  |
|          | 10 minutos           | 3,35               | 2,66-4,69 | 1,90     | 0,54 | 0,34               | 0,26-0,44 | 1,77     | 5,23  |
|          | 20 minutos           | 3,19               | 2,49-4,07 | 1,74     | 0,55 | 0,29               | 0,25-0,34 | 1,42     | 4,86  |
| 8.3      | Nativa               | 2,72               | 2,42-3,07 | 1,31     | 0,48 | 0,24               | 0,21-0,28 | 1,39     | 5,75  |
|          | 1 minuto             | 3,20               | 2,80-3,66 | 1,35     | 0,42 | 0,28               | 0,25-0,31 | 1,27     | 4,60  |
|          | 10 minutos           | 3,08               | 2,35-4,05 | 1,85     | 0,60 | 0,17               | 0,14-0,21 | 1,66     | 9,70  |
|          | 20 minutos           | 2,37               | 1,89-2,98 | 1,67     | 0,70 | 0,10               | 0,08-0,12 | 1,68     | 17,03 |
| 8.4      | Nativa               | 2,84               | 2,51-3,22 | 1,32     | 0,47 | 0,26               | 0,21-0,32 | 1,59     | 6,12  |
|          | 1 minuto             | 2,56               | 2,24-2,91 | 1,34     | 0,52 | 0,24               | 0,19-0,30 | 1,71     | 7,24  |
|          | 10 minutos           | 3,69               | 2,97-4,58 | 1,63     | 0,44 | 0,26               | 0,23-0,30 | 1,36     | 5,24  |
|          | 20 minutos           | 3,40               | 2,81-4,11 | 1,53     | 0,45 | 0,20               | 0,17-0,24 | 1,47     | 7,29  |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

**Figura 23** - Análise gráfica dos índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas



**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3; (D) PRP-IBMP-8.4. Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Wilcoxon. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas.

**Legenda:** IR (índice de reatividade); Neg (amostras negativas); Pos (amostras positivas).

A reprodutibilidade do primeiro ponto da avaliação (proteína nativa) foi comparada com os subsequentes e a determinação do índice de Kappa de Cohen encontra-se descrita na Tabela 10. A Tabela 11 descreve os parâmetros de desempenho para cada uma das condições avaliadas.

**Tabela 10** - Concordância obtida da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas

| Condição de estresse | PROTEÍNA NATIVA |           |              |           |              |           |              |           |
|----------------------|-----------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|
|                      | PRP-IBMP-8.1    |           | PRP-IBMP-8.2 |           | PRP-IBMP-8.3 |           | PRP-IBMP-8.4 |           |
|                      | $\kappa$        | IC95%     | $\kappa$     | IC95%     | $\kappa$     | IC95%     | $\kappa$     | IC95%     |
| <b>1 min</b>         | 1,00            | -         | 1,00         | -         | 1,00         | -         | 0,95         | 0,87-1,00 |
| <b>10 min</b>        | 0,73            | 0,52-0,93 | 0,95         | 0,87-1,00 | 0,95         | 0,87-1,00 | 0,95         | 0,87-1,00 |
| <b>20 min</b>        | 0,86            | 0,71-1,00 | 0,95         | 0,87-1,00 | 0,95         | 0,87-1,00 | 0,95         | 0,87-1,00 |

Fonte: O autor.

Legenda: IC (intervalo de confiança);  $\kappa$  (índice de Kappa de Cohen).

**Tabela 11** – Parâmetros de desempenho obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas

| PRP IBMP | Condição de estresse | Sen (%) (IC95%)  | Esp (%) (IC95%) | Exa (%) (IC95%)  | J (%) |
|----------|----------------------|------------------|-----------------|------------------|-------|
| 8.1      | Nativa               | 100 (85,1-100)   | 100 (85,1-100)  | 100 (92,0-100)   | 100   |
|          | 1 min                | 100 (85,1-100)   | 100 (85,1-100)  | 100 (92,0-100)   | 100   |
|          | 10 min               | 72,7 (51,8-86,8) | 100 (85,1-100)  | 86,4 (73,3-93,6) | 72,7  |
|          | 20 min               | 86,4 (66,7-95,3) | 100 (85,1-100)  | 93,2 (81,8-97,7) | 86,4  |
| 8.2      | Nativa               | 100 (85,1-100)   | 100 (85,1-100)  | 100 (92,0-100)   | 100   |
|          | 1 min                | 100 (85,1-100)   | 100 (85,1-100)  | 100 (92,0-100)   | 100   |
|          | 10 min               | 95,5 (78,2-99,2) | 100 (85,1-100)  | 97,7 (88,2-99,6) | 95,5  |
|          | 20 min               | 95,5 (78,2-99,2) | 100 (85,1-100)  | 97,7 (88,2-99,6) | 95,5  |
| 8.3      | Nativa               | 100 (85,1-100)   | 100 (85,1-100)  | 100 (92,0-100)   | 100   |
|          | 1 min                | 100 (85,1-100)   | 100 (85,1-100)  | 100 (92,0-100)   | 100   |
|          | 10 min               | 95,5 (78,2-99,2) | 100 (85,1-100)  | 97,7 (88,2-99,6) | 95,5  |
|          | 20 min               | 95,5 (78,2-99,2) | 100 (85,1-100)  | 97,7 (88,2-99,6) | 95,5  |
| 8.4      | Nativa               | 100 (85,1-100)   | 100 (85,1-100)  | 100 (92,0-100)   | 100   |
|          | 1 min                | 95,5 (78,2-99,2) | 100 (85,1-100)  | 97,7 (88,2-99,6) | 95,5  |
|          | 10 min               | 95,5 (78,2-99,2) | 100 (85,1-100)  | 97,7 (88,2-99,6) | 95,5  |
|          | 20 min               | 95,5 (78,2-99,2) | 100 (85,1-100)  | 97,7 (88,2-99,6) | 95,5  |

Fonte: O autor.

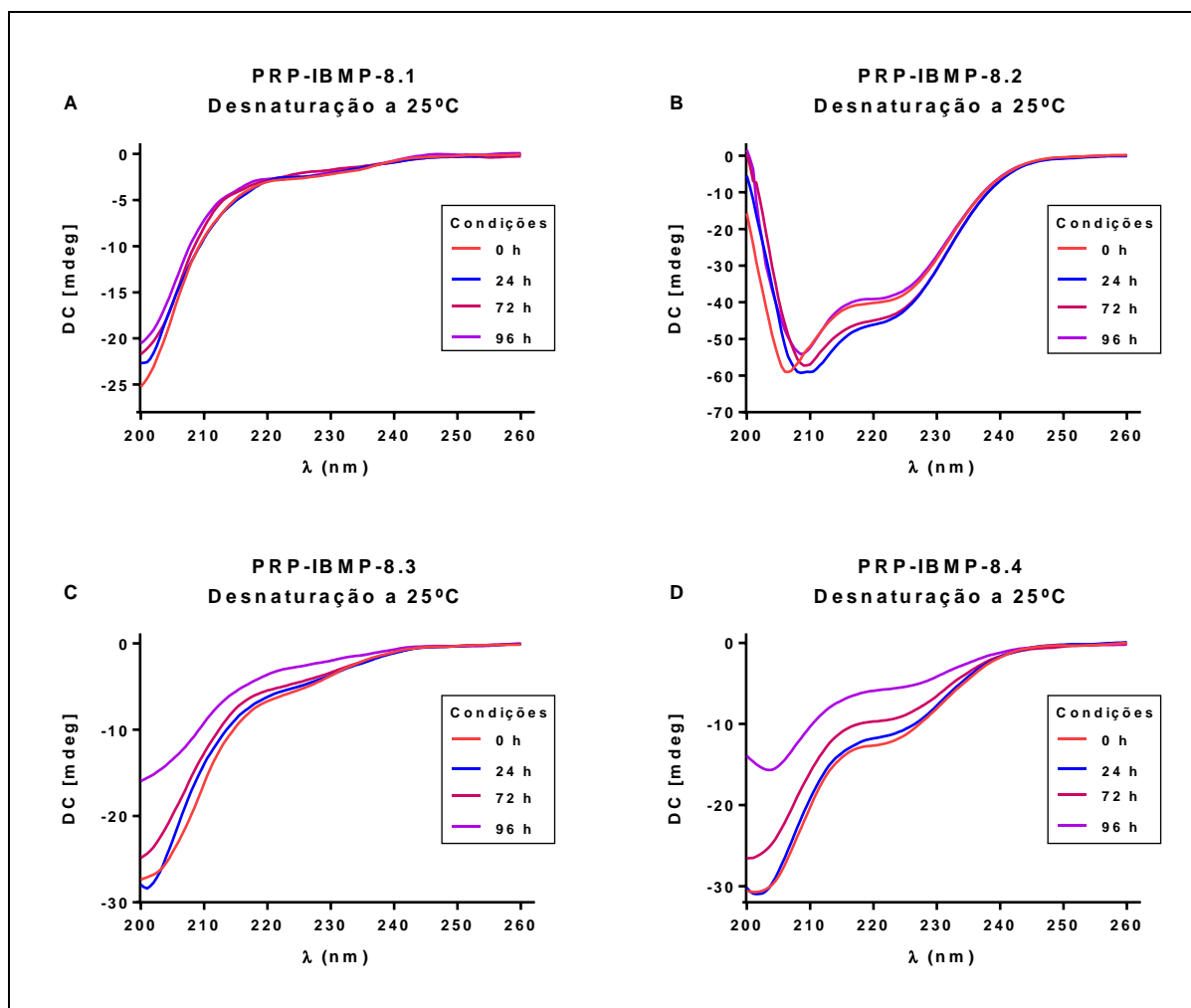
Legenda: Esp (especificidade); Exa (exatidão); IC (intervalo de confiança); J (índice de Youden); Sen (sensibilidade).

#### 7.4.2 Estabilidade a temperatura ambiente

No sistema-tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6), o PRP-IBMP-8.1 apresentou precipitação de 10,1%, 14,0% e 18,6% nos tempos de 24, 72 e 96 horas a 25°C, respectivamente, quando comparado com a proteína nativa (Figura 24A). Para o PRP-IBMP-8.2, os valores apresentados foram de 59,2%, 93,8% e 100%, respectivamente (Figura 24B). Quanto ao PRP-IBMP-8.3 foi verificada precipitação de 2,1% após 24h, 9,2% após 72h e

41,7% após 96h (Figura 24C). E, na avaliação do PRP-IBMP-8.4 foi observada 1,3% de precipitação das amostras após 24h, 13,2% após 72h e 54,5% após 96h (Figura 24D).

**Figura 24** – Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular obtidos da avaliação de estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente

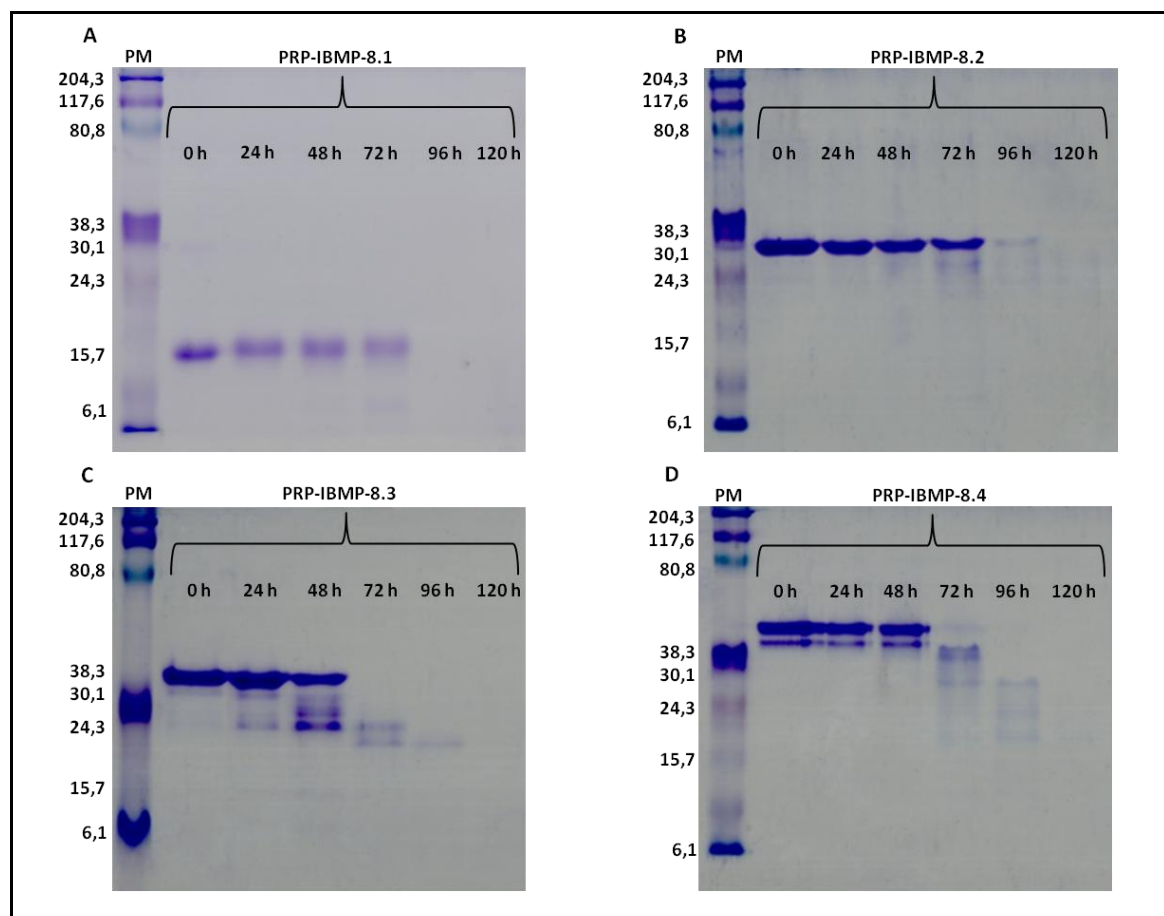


**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3; (D) PRP-IBMP-8.4.

**Legenda:** DC (dicroísmo circular).

A integridade dos PRP-IBMP foi avaliada por SDS-PAGE e os seus resultados estão demonstrados na Figura 25. Os valores médios dos IR determinados para os PRP-IBMP em cada uma das condições analisadas estão descritos na Tabela 12, indicando que, apesar da degradação observada em alguns pontos de análise, os PRP-IBMP continuaram a ser reconhecidos por anticorpos anti-*T. cruzi* presentes nas amostras séricas positivas para a doença de Chagas. A Figura 26, além de apresentar os resultados em forma gráfica, descreve a relação estatística entre as condições de análise, mensurada pelo método de Wilcoxon.

**Figura 25** - Perfil de bandas obtido da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente

**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3; (D) PRP-IBMP-8.4. Em cada poço foi depositado 1  $\mu$ g o antígeno. SDS-PAGE corados pelo azul de Coomassie R250.

**Legenda:** PM = peso molecular em quilodaltons (kDA) (aprotinina – 6,1; lisozima – 15,7; inibidor de tripsina da soja – 30,1; anidrase carbônica – 38,3; BSA – 80,8;  $\beta$ -galactosidase – 117,6; miosina – 204,3).

**Tabela 12** – Índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente

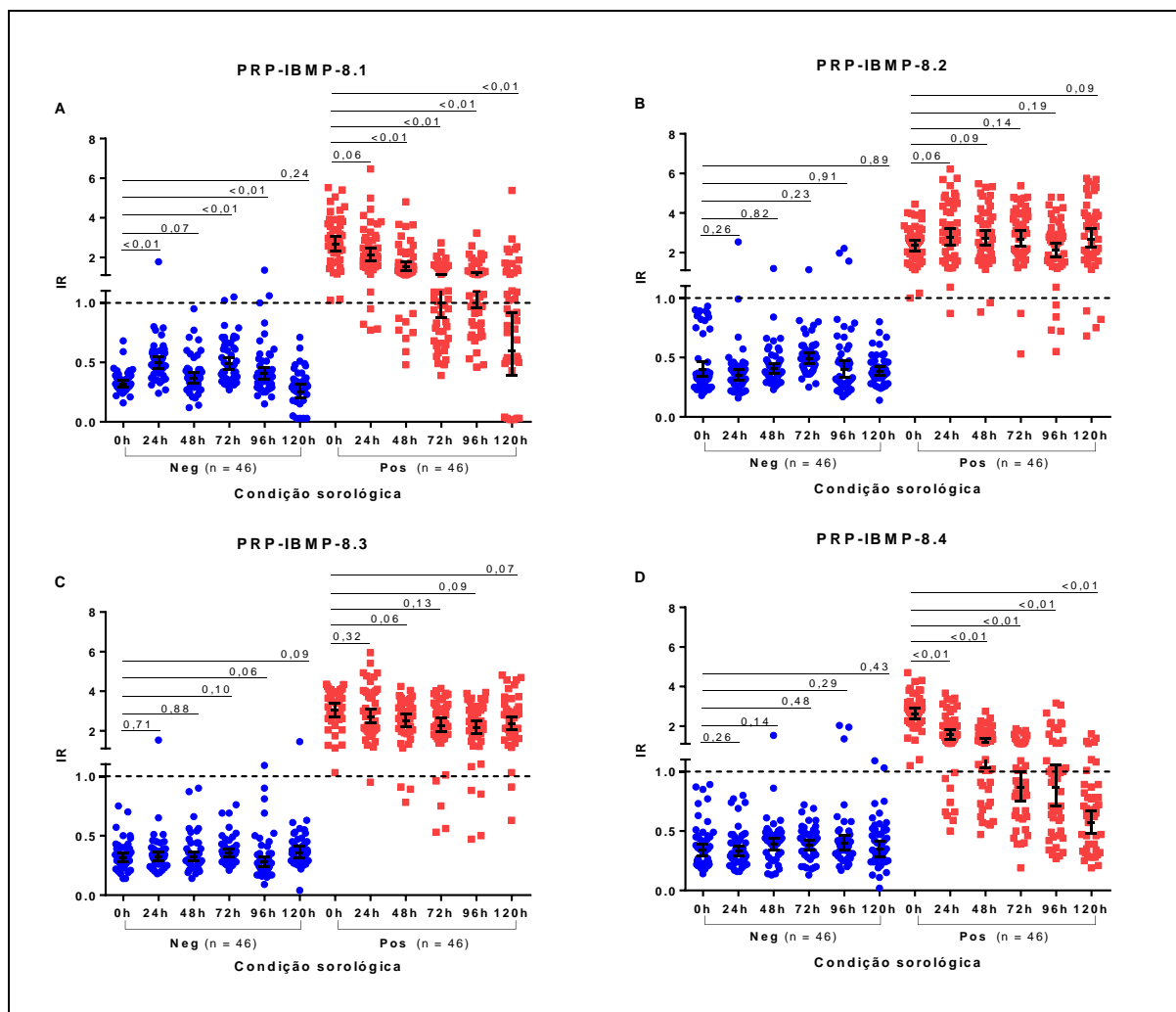
| PRP<br>IBMP | Condição<br>de estresse | AMOSTRAS POSITIVAS |           |          |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |          |      |
|-------------|-------------------------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
|             |                         | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   |
| 8.1         | Nativa                  | 2,68               | 2,34-3,07 | 1,58     | 0,59 | 0,32               | 0,30-0,35 | 1,30     | 4,05 |
|             | 24 h                    | 2,12               | 1,84-2,45 | 1,62     | 0,77 | 0,50               | 0,45-0,55 | 1,39     | 2,80 |
|             | 48 h                    | 1,54               | 1,32-1,78 | 1,65     | 1,08 | 0,37               | 0,33-0,41 | 1,50     | 4,08 |
|             | 72 h                    | 1,00               | 0,88-1,14 | 1,57     | 1,57 | 0,49               | 0,44-0,54 | 1,41     | 2,88 |
|             | 96 h                    | 1,10               | 0,96-1,25 | 1,56     | 1,42 | 0,40               | 0,36-0,46 | 1,55     | 3,83 |
|             | 120 h                   | 0,60               | 0,39-0,92 | 4,27     | 7,16 | 0,25               | 0,19-0,31 | 2,24     | 9,04 |
| 8.2         | Nativa                  | 2,35               | 2,10-2,64 | 1,48     | 0,63 | 0,40               | 0,34-0,46 | 1,66     | 4,15 |
|             | 24 h                    | 2,78               | 2,40-3,24 | 1,66     | 0,60 | 0,35               | 0,31-0,40 | 1,58     | 4,51 |
|             | 48 h                    | 2,69               | 2,35-3,09 | 1,59     | 0,59 | 0,41               | 0,37-0,45 | 1,39     | 3,40 |
|             | 72 h                    | 2,68               | 2,32-3,11 | 1,64     | 0,61 | 0,49               | 0,45-0,54 | 1,34     | 2,73 |
|             | 96 h                    | 2,11               | 1,80-2,48 | 1,72     | 0,82 | 0,40               | 0,34-0,48 | 1,80     | 4,49 |
|             | 120 h                   | 2,69               | 2,27-3,18 | 1,78     | 0,66 | 0,38               | 0,35-0,42 | 1,39     | 3,65 |
| 8.3         | Nativa                  | 3,03               | 2,71-3,38 | 1,45     | 0,48 | 0,32               | 0,28-0,35 | 1,43     | 4,53 |
|             | 24 h                    | 2,72               | 2,39-3,09 | 1,55     | 0,57 | 0,32               | 0,29-0,36 | 1,44     | 4,43 |
|             | 48 h                    | 2,52               | 2,22-2,85 | 1,53     | 0,61 | 0,32               | 0,29-0,36 | 1,48     | 4,61 |
|             | 72 h                    | 2,26               | 1,95-2,63 | 1,66     | 0,74 | 0,35               | 0,32-0,39 | 1,33     | 3,77 |
|             | 96 h                    | 2,17               | 1,86-2,53 | 1,68     | 0,77 | 0,28               | 0,24-0,32 | 1,65     | 5,92 |
|             | 120 h                   | 2,38               | 2,08-2,72 | 1,57     | 0,66 | 0,36               | 0,31-0,41 | 1,59     | 4,44 |
| 8.4         | Nativa                  | 2,61               | 2,36-2,89 | 1,40     | 0,54 | 0,34               | 0,29-0,39 | 1,62     | 4,79 |
|             | 24 h                    | 1,56               | 1,34-1,82 | 1,68     | 1,07 | 0,33               | 0,29-0,37 | 1,53     | 4,65 |
|             | 48 h                    | 1,18               | 1,03-1,35 | 1,57     | 1,33 | 0,38               | 0,33-0,43 | 1,54     | 4,09 |
|             | 72 h                    | 0,87               | 0,75-1,00 | 1,61     | 1,86 | 0,37               | 0,33-0,42 | 1,46     | 3,91 |
|             | 96 h                    | 0,86               | 0,71-1,05 | 1,93     | 2,24 | 0,40               | 0,34-0,46 | 1,64     | 4,14 |
|             | 120 h                   | 0,57               | 0,49-0,67 | 1,72     | 3,02 | 0,34               | 0,28-0,42 | 1,94     | 5,64 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).



**Figura 26** - Análise gráfica dos índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente



**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3; (D) PRP-IBMP-8.4. Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Wilcoxon. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas.

**Legenda:** IR (índice de reatividade); Neg (amostras negativas); Pos (amostras positivas).

A reprodutibilidade do primeiro período da avaliação (proteína nativa) foi comparada aos subsequentes e a determinação do índice de Kappa de Cohen encontra-se descrita na Tabela 13. Os parâmetros de desempenho referentes a cada uma das condições de análise estão descritos na Tabela 14.

**Tabela 13** - Concordância obtida da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente

| Condição de estresse | PROTEÍNA NATIVA |           |              |           |              |           |              |           |
|----------------------|-----------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|
|                      | PRP-IBMP-8.1    |           | PRP-IBMP-8.2 |           | PRP-IBMP-8.3 |           | PRP-IBMP-8.4 |           |
|                      | $\kappa$        | IC95%     | $\kappa$     | IC95%     | $\kappa$     | IC95%     | $\kappa$     | IC95%     |
| 24 h                 | 0,87            | 0,77-0,97 | 0,96         | 0,90-1,00 | 0,96         | 0,90-1,00 | 0,80         | 0,68-0,93 |
| 48 h                 | 0,83            | 0,71-0,94 | 0,93         | 0,86-1,00 | 0,93         | 0,86-1,00 | 0,67         | 0,52-0,82 |
| 72 h                 | 0,46            | 0,27-0,64 | 0,93         | 0,86-1,00 | 0,91         | 0,83-1,00 | 0,48         | 0,30-0,66 |
| 96 h                 | 0,48            | 0,30-0,66 | 0,85         | 0,74-0,96 | 0,89         | 0,80-0,98 | 0,50         | 0,32-0,68 |
| 120 h                | 0,43            | 0,25-0,62 | 0,91         | 0,83-1,00 | 0,93         | 0,86-1,00 | 0,09         | 0,01-0,30 |

Fonte: O autor.

Legenda: IC (intervalo de confiança);  $\kappa$  (índice de Kappa de Cohen).

**Tabela 14** - Parâmetros de desempenho obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente

| PRP IBMP | Condição de estresse | Sen (%) (IC95%)  | Esp (%) (IC95%)  | Exa (%) (IC95%)  | J (%) |
|----------|----------------------|------------------|------------------|------------------|-------|
| 8.1      | Nativa               | 100 (92,3-100)   | 100 (92,3-100)   | 100 (96,0-100)   | 100   |
|          | 24 h                 | 89,1 (77,0-95,3) | 97,8 (88,7-99,6) | 93,5 (86,5-97,0) | 87,0  |
|          | 48 h                 | 82,6 (69,3-90,9) | 100 (92,3-100)   | 82,6 (83,8-95,5) | 82,6  |
|          | 72 h                 | 50,0 (36,1-63,9) | 95,7 (85,5-98,8) | 72,8 (63,0-80,9) | 45,7  |
|          | 96 h                 | 54,3 (40,2-67,8) | 93,5 (82,5-97,8) | 73,9 (64,1-81,8) | 47,8  |
|          | 120 h                | 43,5 (30,2-57,8) | 100 (92,3-100)   | 71,7 (61,8-79,9) | 43,5  |
| 8.2      | Nativa               | 100 (92,3-100)   | 100 (92,3-100)   | 100 (96,0-100)   | 100   |
|          | 24 h                 | 97,8 (88,7-99,6) | 97,8 (88,7-99,6) | 97,8 (92,4-99,4) | 95,7  |
|          | 48 h                 | 95,7 (85,5-98,8) | 97,8 (88,7-99,6) | 96,7 (90,8-98,9) | 93,5  |
|          | 72 h                 | 95,7 (85,5-98,8) | 97,8 (88,7-99,6) | 96,7 (90,8-98,9) | 93,5  |
|          | 96 h                 | 89,1 (77,0-95,3) | 93,5 (82,5-97,8) | 91,3 (83,8-95,5) | 82,6  |
|          | 120 h                | 91,3 (79,7-96,6) | 100 (92,3-100)   | 95,7 (89,3-98,3) | 91,3  |
| 8.3      | Nativa               | 100 (92,3-100)   | 100 (92,3-100)   | 100 (96,0-100)   | 100   |
|          | 24 h                 | 97,8 (88,7-99,6) | 97,8 (88,7-99,6) | 97,8 (92,4-99,4) | 95,7  |
|          | 48 h                 | 93,5 (82,5-97,8) | 100 (92,3-100)   | 96,7 (90,8-98,9) | 93,5  |
|          | 72 h                 | 91,3 (79,7-96,6) | 100 (92,3-100)   | 95,7 (89,3-98,3) | 91,3  |
|          | 96 h                 | 91,3 (79,7-96,6) | 97,8 (88,7-99,6) | 94,6 (87,9-97,7) | 89,1  |
|          | 120 h                | 97,8 (88,4-99,6) | 97,8 (88,7-99,6) | 97,8 (92,3-99,4) | 95,6  |
| 8.4      | Nativa               | 100 (92,3-100)   | 100 (92,3-100)   | 100 (96,0-100)   | 100   |
|          | 24 h                 | 80,4 (66,8-89,3) | 100 (92,3-100)   | 90,2 (82,4-94,8) | 80,4  |
|          | 48 h                 | 69,6 (55,2-80,9) | 97,8 (88,7-99,6) | 83,7 (74,8-89,9) | 67,4  |
|          | 72 h                 | 47,8 (34,1-61,9) | 100 (92,3-100)   | 73,9 (64,1-81,8) | 47,8  |
|          | 96 h                 | 43,5 (30,2-57,8) | 93,5 (82,5-97,8) | 68,5 (58,4-77,1) | 37,0  |
|          | 120 h                | 17,4 (9,1-30,7)  | 95,7 (85,5-98,8) | 56,5 (46,3-66,2) | 13,0  |

Fonte: O autor.

Legenda: Esp (especificidade); Exa (exatidão); IC (intervalo de confiança); J (índice de Youden); Sen (sensibilidade).

## 7.4.3 Estabilidade de longa duração

Os valores médios dos IR encontrados para os PRP-IBMP estão descritos na Tabela 15 e as representações gráficas na Figura 27.

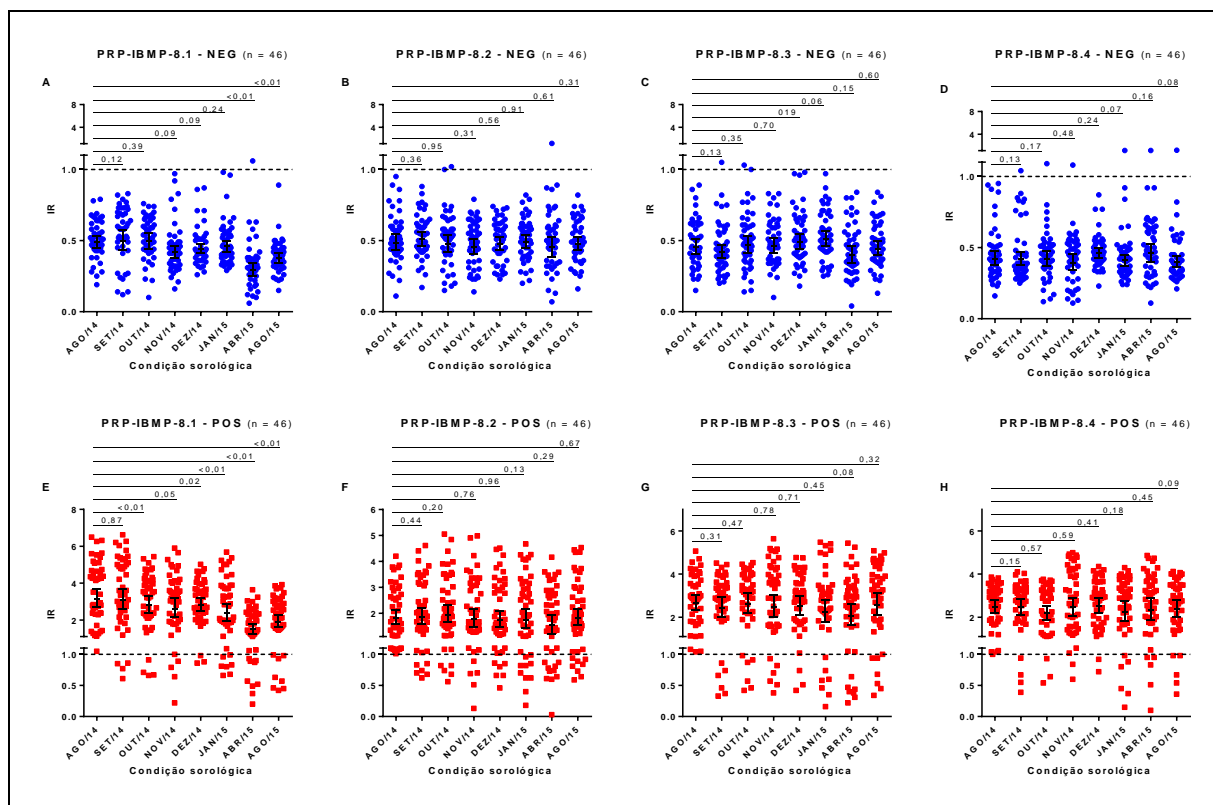
**Tabela 15** - Índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a um período de longa duração

| PRP<br>IBMP | Pontos de<br>análise | AMOSTRAS POSITIVAS |           |          |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |          |      |
|-------------|----------------------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
|             |                      | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   |
| 8.1         | AGO/2014             | 3,15               | 2,69-3,69 | 1,70     | 0,54 | 0,49               | 0,45-0,53 | 1,35     | 2,76 |
|             | SET/2014             | 3,09               | 2,59-3,70 | 1,83     | 0,59 | 0,50               | 0,43-0,58 | 1,62     | 3,24 |
|             | OUT/2014             | 2,79               | 2,37-3,28 | 1,73     | 0,62 | 0,50               | 0,45-0,56 | 1,45     | 2,92 |
|             | NOV/2014             | 2,62               | 2,16-3,17 | 1,91     | 0,73 | 0,42               | 0,37-0,46 | 1,44     | 3,46 |
|             | DEZ/2014             | 2,81               | 2,49-3,18 | 1,51     | 0,54 | 0,44               | 0,41-0,48 | 1,29     | 2,92 |
|             | JAN/2015             | 2,37               | 1,97-2,85 | 1,86     | 0,78 | 0,46               | 0,42-0,50 | 1,33     | 2,91 |
|             | ABR/2015             | 1,50               | 1,26-1,80 | 1,84     | 1,23 | 0,30               | 0,25-0,34 | 1,68     | 5,70 |
|             | AGO/2015             | 1,92               | 1,60-2,29 | 1,82     | 0,95 | 0,38               | 0,35-0,41 | 1,34     | 3,56 |
| 8.2         | AGO/2014             | 1,84               | 1,60-2,11 | 1,60     | 0,87 | 0,49               | 0,43-0,54 | 1,47     | 3,02 |
|             | SET/2014             | 1,87               | 1,59-2,20 | 1,73     | 0,93 | 0,51               | 0,46-0,56 | 1,38     | 2,71 |
|             | OUT/2014             | 1,95               | 1,65-2,30 | 1,74     | 0,90 | 0,48               | 0,42-0,54 | 1,52     | 3,16 |
|             | NOV/2014             | 1,79               | 1,46-2,18 | 1,95     | 1,09 | 0,45               | 0,40-0,51 | 1,47     | 3,25 |
|             | DEZ/2014             | 1,76               | 1,48-2,09 | 1,78     | 1,01 | 0,48               | 0,43-0,52 | 1,38     | 2,90 |
|             | JAN/2015             | 1,75               | 1,42-2,16 | 2,04     | 1,16 | 0,49               | 0,45-0,54 | 1,38     | 2,82 |
|             | ABR/2015             | 1,53               | 1,20-1,95 | 2,27     | 1,48 | 0,44               | 0,38-0,51 | 1,67     | 3,80 |
|             | AGO/2015             | 1,82               | 1,54-2,16 | 1,76     | 0,96 | 0,48               | 0,43-0,53 | 1,40     | 2,93 |
| 8.3         | AGO/2014             | 2,65               | 2,32-3,03 | 1,57     | 0,59 | 0,46               | 0,41-0,51 | 1,46     | 3,20 |
|             | SET/2014             | 2,42               | 2,00-2,93 | 1,91     | 0,79 | 0,40               | 0,36-0,46 | 1,53     | 3,78 |
|             | OUT/2014             | 2,60               | 2,18-3,11 | 1,83     | 0,70 | 0,49               | 0,43-0,55 | 1,51     | 3,10 |
|             | NOV/2014             | 2,46               | 2,01-3,01 | 1,99     | 0,81 | 0,46               | 0,41-0,52 | 1,46     | 3,16 |
|             | DEZ/2014             | 2,51               | 2,12-2,97 | 1,76     | 0,70 | 0,49               | 0,44-0,55 | 1,43     | 2,91 |
|             | JAN/2015             | 2,24               | 1,79-2,80 | 2,13     | 0,95 | 0,51               | 0,46-0,57 | 1,40     | 2,72 |
|             | ABR/2015             | 2,07               | 1,75-2,45 | 2,24     | 1,08 | 0,39               | 0,34-0,46 | 1,69     | 4,29 |
|             | AGO/2015             | 2,55               | 2,08-3,13 | 1,98     | 0,78 | 0,44               | 0,40-0,50 | 1,46     | 3,28 |
| 8.4         | AGO/2014             | 2,47               | 2,19-2,78 | 1,49     | 0,60 | 0,42               | 0,37-0,47 | 1,48     | 3,52 |
|             | SET/2014             | 2,46               | 2,11-2,86 | 1,67     | 0,68 | 0,42               | 0,38-0,47 | 1,47     | 3,49 |
|             | OUT/2014             | 2,19               | 1,89-2,53 | 1,64     | 0,75 | 0,42               | 0,37-0,47 | 1,53     | 3,66 |
|             | NOV/2014             | 2,46               | 2,08-2,90 | 1,76     | 0,72 | 0,39               | 0,34-0,45 | 1,61     | 4,11 |
|             | DEZ/2014             | 2,52               | 2,21-2,87 | 1,55     | 0,61 | 0,46               | 0,43-0,49 | 1,27     | 2,77 |
|             | JAN/2015             | 2,25               | 1,82-2,77 | 2,02     | 0,90 | 0,41               | 0,37-0,45 | 1,39     | 3,40 |
|             | ABR/2015             | 2,32               | 1,88-2,87 | 2,04     | 0,88 | 0,46               | 0,40-0,52 | 1,57     | 3,41 |
|             | AGO/2015             | 2,38               | 2,01-2,81 | 1,76     | 0,74 | 0,40               | 0,36-0,44 | 1,39     | 3,47 |

Fonte: O autor.

Legenda:  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

**Figura 27** - Análise gráfica dos índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a um período de longa duração



**Fonte:** O autor.

**Nota:** PRP-IBMP-8.1 (A e E); PRP-IBMP-8.2 (B e F); PRP-IBMP-8.3 (C e G); PRP-IBMP-8.4 (D e H). Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Wilcoxon. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas.

**Legenda:** IR (índice de reatividade); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

A reprodutibilidade do primeiro período da avaliação (AGO/2014) foi comparada com os subsequentes e a determinação do índice de Kappa de Cohen encontra-se descrita na Tabela 16. Conforme representado na Tabela 17, os parâmetros de desempenho calculados variaram de acordo com as condições testadas.

**Tabela 16** - Concordância obtida da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a um período de longa duração

| Condição de estresse | PROTEÍNA NATIVA |           |              |           |              |           |              |           |
|----------------------|-----------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|
|                      | PRP-IBMP-8.1    |           | PRP-IBMP-8.2 |           | PRP-IBMP-8.3 |           | PRP-IBMP-8.4 |           |
|                      | $\kappa$        | IC95%     | $\kappa$     | IC95%     | $\kappa$     | IC95%     | $\kappa$     | IC95%     |
| SET 2014             | 0,91            | 0,83-1,00 | 0,87         | 0,77-0,97 | 0,85         | 0,74-0,96 | 0,89         | 0,80-0,98 |
| OUT 2014             | 0,91            | 0,83-1,00 | 0,85         | 0,74-0,96 | 0,83         | 0,71-0,94 | 0,91         | 0,83-1,00 |
| NOV 2014             | 0,91            | 0,83-1,00 | 0,87         | 0,77-0,97 | 0,87         | 0,77-0,97 | 0,93         | 0,86-1,00 |
| DEZ 2014             | 0,93            | 0,86-1,00 | 0,87         | 0,77-0,97 | 0,93         | 0,86-1,00 | 0,96         | 0,90-1,00 |
| JAN 2015             | 0,85            | 0,74-0,96 | 0,78         | 0,66-0,91 | 0,85         | 0,74-0,96 | 0,85         | 0,74-0,96 |
| ABR 2015             | 0,78            | 0,66-0,91 | 0,74         | 0,60-0,88 | 0,85         | 0,74-0,96 | 0,89         | 0,80-0,98 |
| AGO 2015             | 0,83            | 0,71-0,94 | 0,83         | 0,71-0,94 | 0,87         | 0,77-0,97 | 0,87         | 0,77-0,97 |

Fonte: O autor.

Legenda: IC (intervalo de confiança);  $\kappa$  (índice de Kappa de Cohen).

**Tabela 17** - Parâmetros de desempenho obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a um período de longa duração

| PRP<br>IBMP | Pontos de<br>análise | AUC<br>(IC95%)   | Sen (%)<br>(IC95%) | Esp (%)<br>(IC95%) | Exa (%)<br>(IC95%) | J<br>(%) |
|-------------|----------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|
| 8.1         | AGO/2014             | 1,00             | 100 (92,3-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (96,0-100)     | 100      |
|             | SET/2014             | 0,99 (0,97-1,00) | 91,3 (79,7-96,6)   | 100 (92,3-100)     | 95,7 (89,3-98,3)   | 91,3     |
|             | OUT-2014             | 0,99 (0,98-1,00) | 91,3 (79,7-96,6)   | 100 (92,3-100)     | 95,7 (89,3-98,3)   | 91,3     |
|             | NOV/2014             | 0,97 (0,93-1,00) | 91,3 (79,7-96,6)   | 100 (92,3-100)     | 95,7 (89,3-98,3)   | 91,3     |
|             | DEZ/2014             | 0,99 (0,99-1,00) | 93,5 (82,5-97,8)   | 100 (92,3-100)     | 96,7 (90,8-98,9)   | 93,5     |
|             | JAN/2015             | 0,99 (0,98-1,00) | 84,8 (71,8-92,4)   | 100 (92,3-100)     | 92,4 (85,1-96,3)   | 84,8     |
|             | ABR/2015             | 0,97 (0,93-1,00) | 80,4 (66,8-89,3)   | 97,8 (88,7-99,6)   | 89,1 (81,1-94,0)   | 78,3     |
|             | AGO/2015             | 0,98 (0,96-1,00) | 82,6 (69,3-90,9)   | 100 (92,3-100)     | 91,3 (83,8-95,5)   | 82,6     |
| 8.2         | AGO/2014             | 1,00             | 100 (92,3-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (96,0-100)     | 100      |
|             | SET/2014             | 0,98 (0,97-1,00) | 87,0 (74,3-93,9)   | 100 (92,3-100)     | 93,5 (86,5-97,0)   | 87,0     |
|             | OUT-2014             | 0,99 (0,99-1,00) | 89,1 (77,0-95,3)   | 95,7 (85,5-98,8)   | 92,4 (85,1-96,3)   | 84,8     |
|             | NOV/2014             | 0,97 (0,92-1,00) | 87,0 (74,3-93,9)   | 100 (92,3-100)     | 93,5 (86,5-97,0)   | 87,0     |
|             | DEZ/2014             | 0,98 (0,95-1,00) | 87,0 (74,3-93,9)   | 100 (92,3-100)     | 93,5 (86,5-97,0)   | 87,0     |
|             | JAN/2015             | 0,95 (0,90-1,00) | 78,3 (64,4-87,7)   | 100 (92,3-100)     | 89,1 (81,1-94,0)   | 78,3     |
|             | ABR/2015             | 0,95 (0,90-1,00) | 76,1 (62,1-86,1)   | 97,8 (88,7-99,6)   | 87,0 (78,6-92,4)   | 73,9     |
|             | AGO/2015             | 0,99 (0,97-1,00) | 82,6 (69,3-90,9)   | 100 (92,3-100)     | 91,3 (83,8-95,5)   | 82,6     |
| 8.3         | AGO/2014             | 1,00             | 100 (92,3-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (96,0-100)     | 100      |
|             | SET/2014             | 0,96 (91,0-1,00) | 87,0 (74,3-93,9)   | 97,8 (88,7-99,6)   | 92,4 (85,1-96,3)   | 84,8     |
|             | OUT/2014             | 0,96 (92,1-1,00) | 87,0 (74,3-93,9)   | 95,7 (85,5-98,8)   | 91,3 (83,8-95,5)   | 82,6     |
|             | NOV/2014             | 0,97 (93,1-1,00) | 87,0 (74,3-93,9)   | 100 (92,3-100)     | 93,5 (86,5-97,0)   | 87,0     |
|             | DEZ/2014             | 0,97 (93,8-1,00) | 93,5 (82,5-97,8)   | 100 (92,3-100)     | 96,7 (90,8-98,9)   | 93,5     |
|             | JAN/2015             | 0,93 (86,4-0,99) | 84,8 (71,8-92,4)   | 100 (92,3-100)     | 92,4 (85,1-96,3)   | 84,8     |
|             | ABR/2015             | 0,92 (85,4-0,98) | 84,8 (71,8-92,4)   | 100 (92,3-100)     | 92,4 (85,1-96,3)   | 84,8     |
|             | AGO/2015             | 0,96 (91,8-1,00) | 87,0 (74,3-93,9)   | 100 (92,3-100)     | 93,5 (86,5-97,0)   | 87,0     |
| 8.4         | AGO/2014             | 1,00             | 100 (92,3-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (96,0-100)     | 100      |
|             | SET/2014             | 0,98 (0,96-1,00) | 91,3 (79,7-96,6)   | 97,8 (88,7-99,6)   | 94,6 (87,9-97,7)   | 89,1     |
|             | OUT/2014             | 0,99 (0,98-1,00) | 93,5 (82,5-97,8)   | 97,8 (88,7-99,6)   | 95,7 (89,3-98,3)   | 91,3     |
|             | NOV/2014             | 0,99 (0,99-1,00) | 95,7 (85,5-98,8)   | 97,8 (88,7-99,6)   | 96,7 (90,8-98,9)   | 93,5     |
|             | DEZ/2014             | 0,99 (0,99-1,00) | 95,7 (85,5-98,8)   | 100 (92,3-100)     | 97,8 (92,4-99,4)   | 95,7     |
|             | JAN/2015             | 0,96 (0,91-1,00) | 87,0 (74,3-93,9)   | 97,8 (88,7-99,6)   | 92,4 (85,1-96,3)   | 84,8     |
|             | ABR/2015             | 0,97 (0,92-1,00) | 89,1 (77,0-95,3)   | 100 (92,3-100)     | 94,6 (87,9-97,7)   | 89,1     |
|             | AGO/2015             | 0,98 (0,95-1,00) | 89,1 (77,0-95,3)   | 97,8 (88,7-99,6)   | 93,5 (86,5-97,0)   | 87,0     |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** AUC (área abaixo da curva); Esp (especificidade); Exa (exatidão); IC (intervalo de confiança); J (índice de Youden); Sen (sensibilidade).

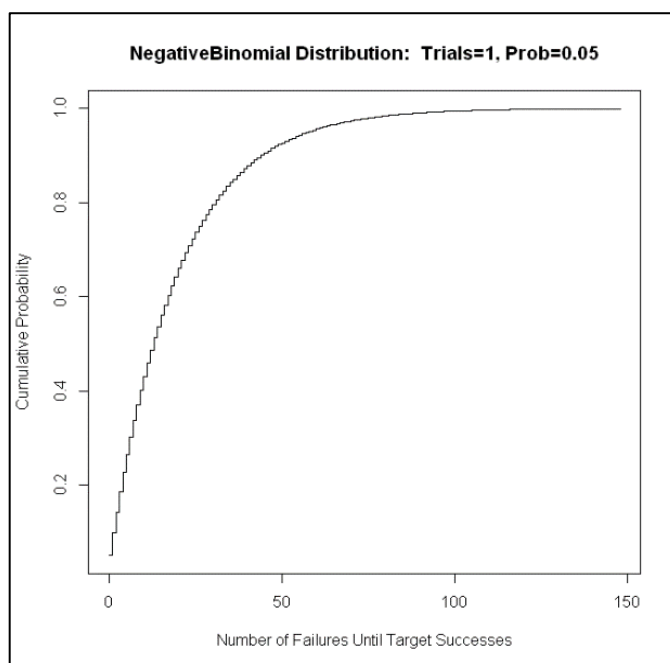
## 7.5 População do estudo

### 7.5.1 Dimensionamento amostral

A amostragem foi estimada em 380 amostras positivas e 380 negativas para a doença de Chagas. Para avaliação de reações cruzadas a distribuição binominal negativa estimou que,

para cada 100 amostras analisadas, haveria 5% de chance de se encontrar uma reação cruzada (Figura 28).

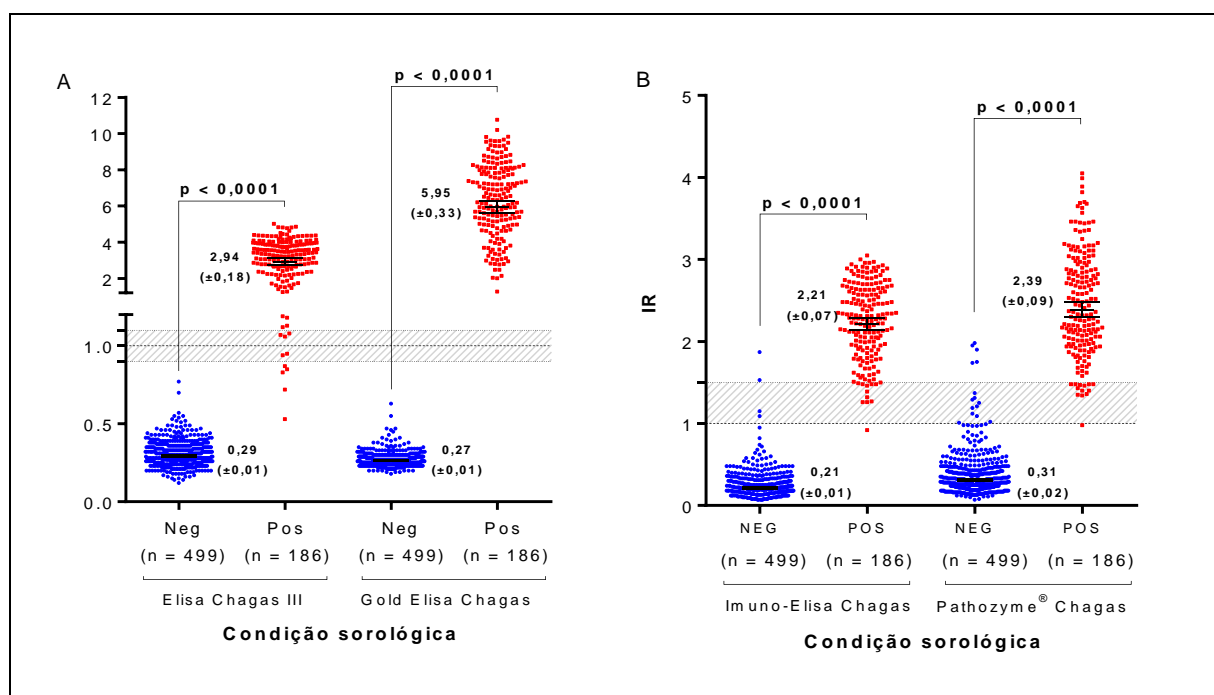
**Figura 28** - Distribuição binomial negativa para estimativa do  $n$  amostral para avaliação de reação cruzada utilizando os PRP-IBMP



**Fonte:** O autor.

### 7.5.2 Definição do padrão-ouro

O estudo comparativo entre o Elisa Chagas III, o Imuno-Elisa Wama, o Pathozyme® Chagas e o Gold Elisa Chagas foi conduzido utilizando 499 amostras negativas e 186 positivas para a doença de Chagas. De acordo com a Figura 29, todos os kits foram capazes de diferenciar amostras negativas das positivas ( $p < 0,0001$ ).

**Figura 29** – Análise gráfica dos índices de reatividade de quatro kits comerciais para definição do padrão-ouro

**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) Elisa Chagas III e Gold Elisa Chagas; (B) Imuno-Elisa Chagas e Pathozyme® Chagas. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ( $CO \pm 10\%$ ). Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Wilcoxon.

**Legenda:** IR (índice de reatividade); Neg (amostras negativas); Pos (amostras positivas).

As Tabelas 18 e 19 trazem, respectivamente, a avaliação dos parâmetros de desempenho e os valores médios dos IR.

**Tabela 18** - Parâmetros de desempenho de quatro kits comerciais para definição do padrão-ouro

| PAR      | Elisa Chagas III |           | Imuno-Elisa Chagas |           | Gold Elisa Chagas |          | Pathozyme® Chagas |           |
|----------|------------------|-----------|--------------------|-----------|-------------------|----------|-------------------|-----------|
|          | %                | IC95%     | %                  | (IC95%)   | %                 | IC95%    | %                 | IC95%     |
| Sen      | 97,3             | 93,8-98,8 | 99,5               | 97,0-99,9 | 100               | 98,0-100 | 99,5              | 97,0-99,9 |
| Esp      | 100              | 99,2-100  | 99,2               | 98,0-99,7 | 100               | 99,2-100 | 97,0              | 95,1-98,2 |
| Exa      | 99,0             | 97,9-99,5 | 99,3               | 98,3-99,7 | 100               | 99,4-100 | 97,7              | 96,2-98,6 |
| J        | 96,9             | -         | 98,7               | -         | 100               | -        | 96,5              | -         |
| $\kappa$ | 97,4             | 95,5-99,3 | 98,2               | 96,6-99,8 | 100               | -        | 94,2              | 91,4-97,0 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** Esp (especificidade); Exa (exatidão); IC (intervalo de confiança); J (índice de Younden);  $\kappa$  (coeficiente de Kappa de Cohen); PAR (parâmetros de desempenho); Sen (sensibilidade).



**Tabela 19** - Índices de reatividade de quatro kits comerciais para definição do padrão-ouro

| Kits comerciais               | AMOSTRAS POSITIVAS |           |          |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |          |      |
|-------------------------------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
|                               | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   |
| Elisa Chagas III              | 2,94               | 2,76-3,12 | 1,54     | 0,33 | 0,29               | 0,28-0,30 | 1,29     | 0,27 |
| Imuno-Elisa Chagas            | 2,21               | 2,14-2,28 | 1,25     | 0,20 | 0,21               | 0,20-0,22 | 1,64     | 0,67 |
| Gold Elisa Chagas             | 5,95               | 5,62-6,28 | 1,46     | 0,32 | 0,27               | 0,26-0,27 | 1,16     | 0,17 |
| Pathozyme <sup>®</sup> Chagas | 2,39               | 2,30-2,48 | 1,30     | 0,25 | 0,31               | 0,29-0,33 | 1,72     | 0,71 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

### 7.5.3 Obtenção e caracterização dos painéis sorológicos

As amostras séricas que compuseram o painel sorológico foram cedidas por Instituições parceiras e encaminhadas ao SRDC, onde foram reavaliadas para a presença ou ausência de anticorpos IgG anti-Chagas, conforme descrito na Tabela 20. As amostras negativas para Chagas e positivas para as demais doenças infecto-parasitárias foram avaliadas para verificação da possibilidade de co-infecção com a doença de Chagas. Do quantitativo de 3047 amostras recebidas, 2625 participaram do estudo e 422 (13,8%) foram excluídas por não satisfazerem os critérios de inclusão.

## 7.6 Avaliação do potencial diagnóstico dos PRP-IBMP

### 7.6.1 Estudo de fase I

A avaliação sorológica utilizando 280 amostras séricas positivas e 20 negativas para a doença de Chagas mostrou áreas abaixo da curva (AUC) de 99,64%, 99,43%, 98,39% e 99,98% para os PRP-IBMP-8.1, 8.2, 8.3 e 8.4, respectivamente. Conforme a Tabela 21, a avaliação da sensibilidade e especificidade exibiu valores acima de 95% e 90%, respectivamente, para os PRP-IBMP.

Tabela 20 - Painel sorológico das amostras utilizadas para avaliação do potencial diagnóstico dos PRP-IBMP

| Patologia        | CPqAM   |          | HEMOPE  |          | LACEN PE |          | UFG     |          | LACEN PR |          | Painel AEQ |          | Painel Internacional |          | TOTAL        |                              |
|------------------|---------|----------|---------|----------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|------------|----------|----------------------|----------|--------------|------------------------------|
|                  | n usado | n cedido | n usado | n cedido | n usado  | n cedido | n usado | n cedido | n usado  | n cedido | n usado    | n cedido | n usado              | n cedido | n usado      | n cedido                     |
| Doença de Chagas | 551     | 519      | 28      | 27       | 54       | 50       | 234     | 193      | 36       | 36       | 27         | 24       | 8                    | 8        | 938          | 857                          |
| Negativas        | 20      | 19       | 506     | 502      | -        | -        | 63      | 59       | 50       | 50       | 45         | 45       | 14                   | 14       | 698          | 689                          |
| Dengue           |         |          | -       | -        | 50       | 50       | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 50           | 50                           |
| Esquistossomose  | 43      | 42       | -       | -        | -        | -        | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 43           | 42                           |
| Filariose        | 51      | 51       | -       | -        | -        | -        | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 51           | 51                           |
| HBC              | 4       | 4        | 52      | 49       | 31       | 27       | 2       | 2        | -        | -        | 30         | 30       | 48                   | 48       | 167          | 160                          |
| HCV              | 11      | 10       | 34      | 32       | 16       | 16       | -       | -        | -        | -        | 16         | 16       | 13                   | 13       | 90           | 87                           |
| HIV              |         |          | 42      | 40       | 73       | 68       | -       | -        | -        | -        | 26         | 26       | 6                    | 6        | 147          | 140                          |
| HTLV             | 4       | 3        | 35      | 34       | 23       | 23       | -       | -        | -        | -        | 28         | 28       | 20                   | 20       | 110          | 108                          |
| Leishmaniose     | 417     | 138      | -       | -        | 8        | 0        | 19      | 15       | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 444          | 153                          |
| Leptospirose     | -       | -        | -       | -        | 100      | 92       | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 100          | 92                           |
| Rubéola          | -       | -        | -       | -        | 18       | 15       | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 18           | 15                           |
| Sarampo          | -       | -        | -       | -        | 24       | 21       | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 24           | 21                           |
| Sífilis          | -       | -        | 115     | 108      | -        | -        | -       | -        | -        | -        | 30         | 30       | -                    | -        | 145          | 138                          |
| HBV/HCV          | -       | -        | -       | -        | -        | -        | -       | -        | -        | -        | 7          | 7        | -                    | -        | 7            | 7                            |
| HBV/HCV/sífilis  | -       | -        | 1       | 1        | -        | -        | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 1            | 1                            |
| HBV/HIV          | -       | -        | 1       | 1        | -        | -        | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 1            | 1                            |
| HBV/sífilis      | -       | -        | 2       | 2        | -        | -        | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 2            | 2                            |
| HCV/sífilis      | -       | -        | 2       | 2        | -        | -        | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 2            | 2                            |
| HCV/HTLV/sífilis | -       | -        | 1       | 1        | -        | -        | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 1            | 1                            |
| HIV/sífilis      | -       | -        | 7       | 7        | -        | -        | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 7            | 7                            |
| HTLV/sífilis     | -       | -        | 1       | 1        | -        | -        | -       | -        | -        | -        | -          | -        | -                    | -        | 1            | 1                            |
|                  |         |          |         |          |          |          |         |          |          |          |            |          |                      |          | <b>TOTAL</b> | <b>1411 1079</b>             |
|                  |         |          |         |          |          |          |         |          |          |          |            |          |                      |          |              | <b>TOTAL GERAL 3047 2625</b> |

Fonte: O autor.

**Tabela 21** - Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na fase I do estudo

| PAR        | PRP-IBMP-8.1 |             | PRP-IBMP-8.2 |             | PRP-IBMP-8.3 |             | PRP-IBMP-8.4 |             |
|------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
|            | %            | IC95%       | %            | IC95%       | %            | IC95%       | %            | IC95%       |
| <b>AUC</b> | 99,64        | 98,94-100   | 99,43        | 98,74-100   | 98,39        | 96,39-100   | 99,86        | 99,92-100   |
| <b>Sen</b> | 98,93        | 96,90-99,63 | 98,21        | 95,89-99,23 | 95,36        | 92,22-97,27 | 99,64        | 98,01-99,94 |
| <b>Esp</b> | 100          | 83,89-100   | 90,00        | 69,90-97,21 | 95,00        | 76,39-99,11 | 100          | 83,89-100   |
| <b>PFN</b> | 1,07         | 0,37-3,10   | 1,79         | 0,77-4,11   | 4,64         | 2,73-7,78   | 0,36         | 0,06-1,99   |
| <b>PFP</b> | 0,0          | -           | 10,00        | 2,79-30,10  | 5,00         | 0,89-23,61  | 0,0          | -           |
| <b>ET</b>  | 1,00         | 0,34-2,90   | 2,33         | 1,13-4,74   | 4,67         | 2,80-7,68   | 0,33         | 0,06-1,86   |
| <b>Exa</b> | 99,00        | 97,10-99,66 | 97,67        | 95,26-98,87 | 95,33        | 92,32-97,20 | 99,67        | 98,14-99,94 |
| <b>J</b>   | 98,93        | -           | 88,21        | -           | 90,36        | -           | 99,64        | -           |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** AUC (área abaixo da curva); Esp (especificidade); ET (erro total); Exa (exatidão); IC (intervalo de confiança); J (índice de Younden); PAR (parâmetros de desempenho); PFN (proporção de falso-negativos); PFP (proporção de falso-positivos); Sen (sensibilidade).

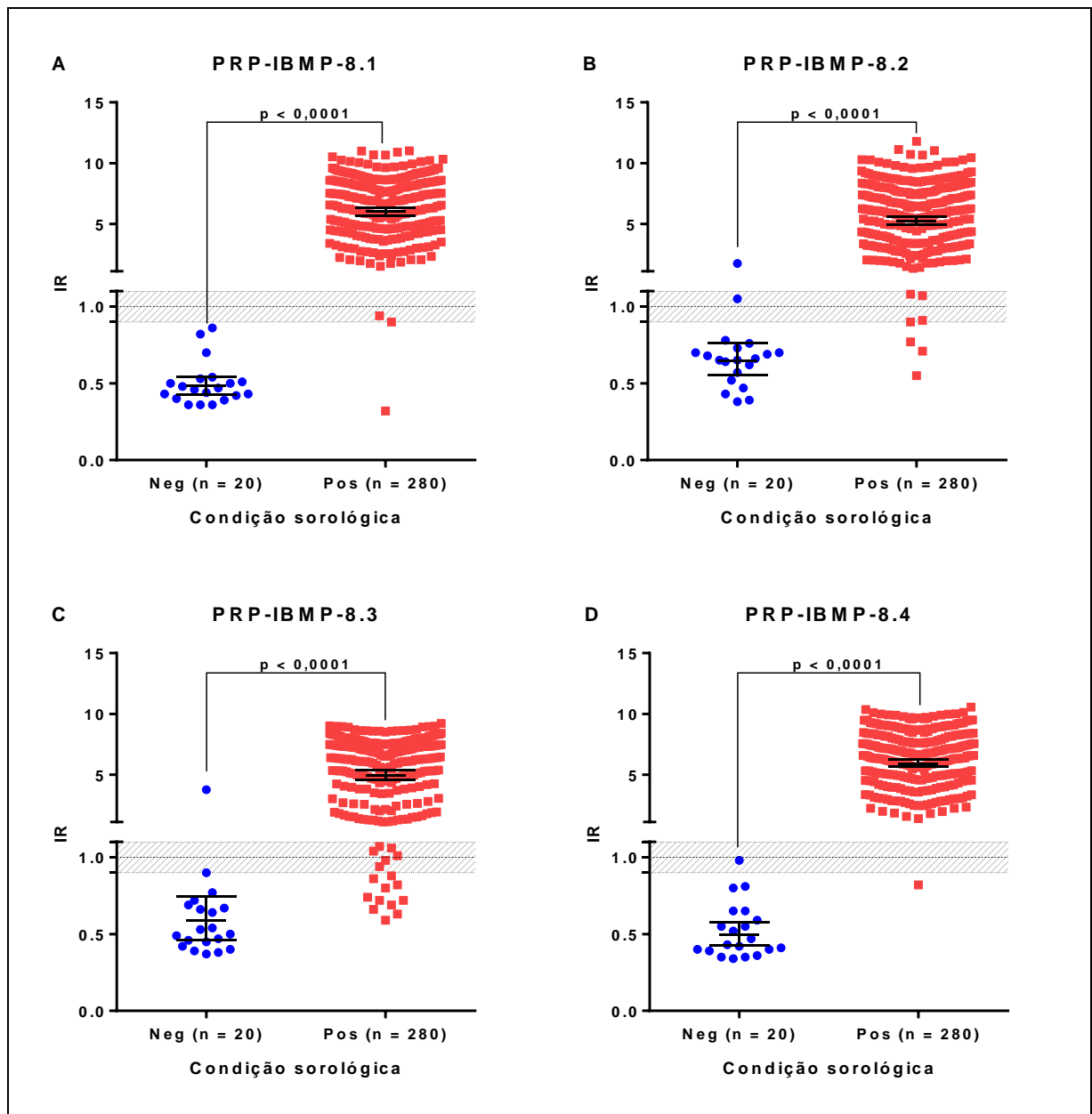
Os valores médios dos IR estão discriminados por molécula na Tabela 22. A análise gráfica dos dados pode ser verificada na Figura 30.

**Tabela 22** - Índice de reatividade dos PRP-IBMP na fase I do estudo

| PRP-IBMP   | AMOSTRAS POSITIVAS |           |          |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |          |      |
|------------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
|            | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   |
| <b>8.1</b> | 6,01               | 5,68-6,36 | 1,62     | 0,27 | 0,48               | 0,43-0,54 | 1,28     | 2,66 |
| <b>8.2</b> | 5,26               | 4,93-5,61 | 1,75     | 0,33 | 0,65               | 0,55-0,76 | 1,40     | 2,16 |
| <b>8.3</b> | 4,96               | 4,59-5,37 | 1,96     | 0,40 | 0,59               | 0,46-0,74 | 1,66     | 2,83 |
| <b>8.4</b> | 5,93               | 5,64-6,23 | 1,53     | 0,26 | 0,50               | 0,43-0,57 | 1,37     | 2,76 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

**Figura 30** – Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na fase I do estudo

**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3; (D) PRP-IBMP-8.4. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ( $CO \pm 10\%$ ). Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Wilcoxon.

**Legenda:** IR (índice de reatividade); Neg (amostras negativas); Pos (amostras positivas).

### 7.6.2 Estudo de fase II

A avaliação sorológica dos PRP-IBMP foi realizada utilizando o painel sorológico descrito na Tabela 20, ou seja, 857 amostras positivas para a doença de Chagas e 689 negativas. Os parâmetros de desempenho estimados para os quatro PRP-IBMP encontram-se

descritos na Tabela 23 e os valores médios dos IR estão discriminados por molécula na Tabela 24. As análises gráficas dos IR estão representadas na Figura 31.

**Tabela 23** - Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na fase II do estudo

| PAR | PRP-IBMP-8.1 |             | PRP-IBMP-8.2 |             | PRP-IBMP-8.3 |             | PRP-IBMP-8.4 |             |
|-----|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
|     | %            | IC95%       | %            | IC95%       | %            | IC95%       | %            | IC95%       |
| AUC | 99,77        | 99,53-100   | 99,85        | 99,76-99,94 | 99,90        | 99,81-99,99 | 99,99        | 99,98-100   |
| Sen | 97,43        | 96,14-98,30 | 94,28        | 92,52-95,65 | 97,90        | 96,70-98,67 | 99,30        | 98,48-99,68 |
| Esp | 99,42        | 98,52-99,77 | 99,56        | 98,73-99,85 | 99,85        | 99,18-99,97 | 100          | 99,45-100   |
| PFN | 2,57         | 1,70-3,86   | 5,72         | 4,35-7,48   | 2,10         | 1,33-3,30   | 0,70         | 0,32-1,52   |
| PFP | 0,58         | 0,23-1,48   | 0,44         | 0,15-1,27   | 0,15         | 0,03-0,82   | 0,00         | -           |
| ET  | 1,68         | 1,15-2,45   | 3,36         | 2,57-4,38   | 1,23         | 0,79-1,91   | 0,39         | 0,18-0,84   |
| Exa | 98,32        | 97,55-98,85 | 96,64        | 95,62-97,43 | 98,77        | 98,09-99,21 | 99,61        | 99,16-99,82 |
| J   | 96,85        | -           | 93,85        | -           | 97,75        | -           | 99,30        | -           |
| RV+ | 168          | 63-446      | 217          | 70-670      | 674          | 95-4782     | 1986*        | 70-56087    |
| RV- | 0,026        | 0,017-0,039 | 0,057        | 0,044-0,075 | 0,021        | 0,013-0,033 | 0,007        | 0,003-0,016 |

**Fonte:** O autor.

**Nota:** \*Valor estimado.

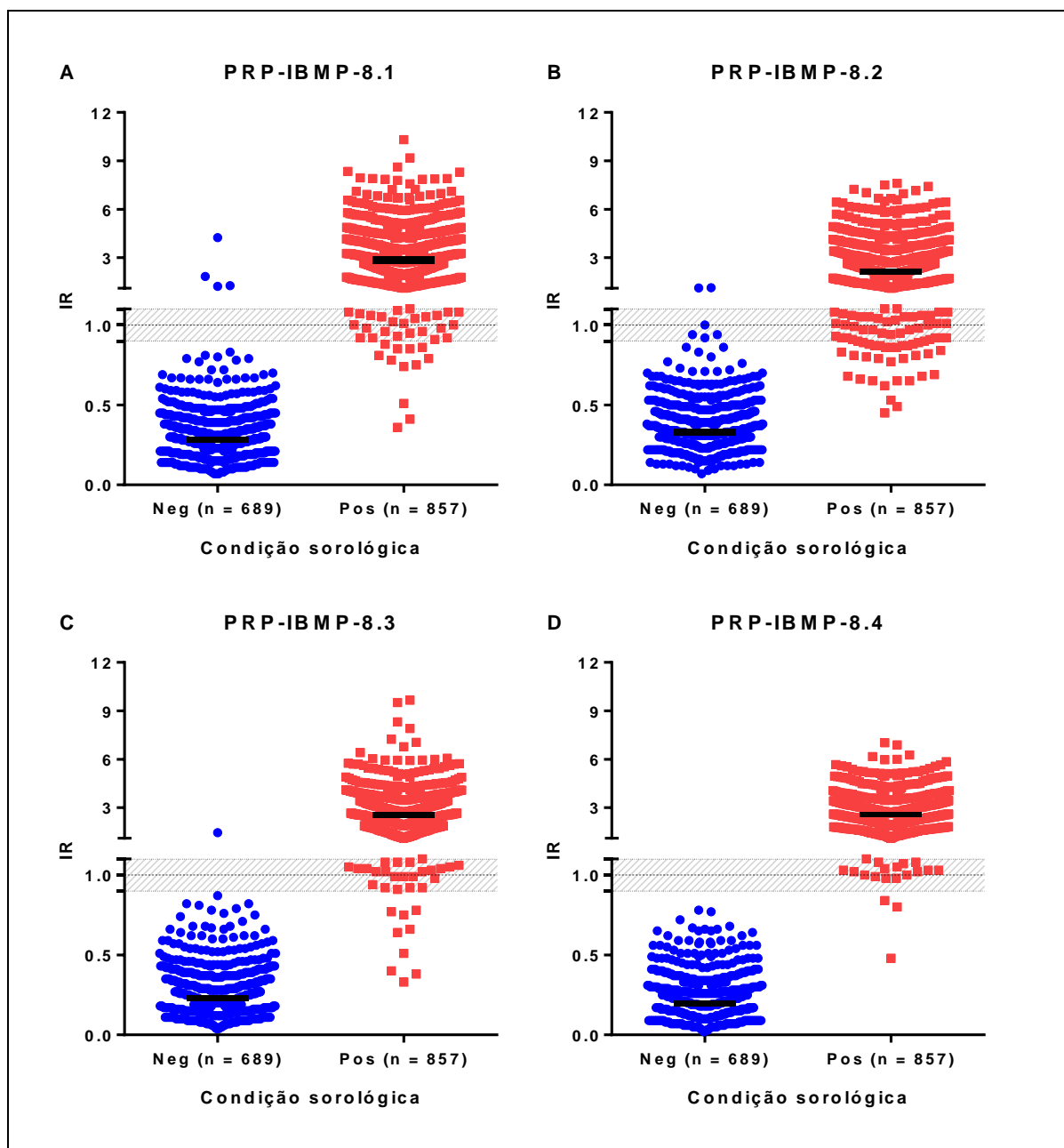
**Legenda:** AUC (área abaixo da curva); Esp (especificidade); ET (erro total); Exa (exatidão); IC (intervalo de confiança); J (índice de Younden); PAR (parâmetros de desempenho); PFN (proporção de falso-negativos); PFP (proporção de falso-positivos); RV (razão de verossimilhança); Sen (sensibilidade).

**Tabela 24** - Índice de reatividade dos PRP-IBMP na fase II do estudo

| PRP-IBMP | AMOSTRAS POSITIVAS |           |          |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |          |      |
|----------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
|          | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   |
| 8.1      | 2,84               | 2,74-2,94 | 1,68     | 0,59 | 0,28               | 0,27-0,29 | 1,60     | 5,67 |
| 8.2      | 2,15               | 2,08-2,23 | 1,68     | 0,78 | 0,33               | 0,32-0,34 | 1,50     | 4,55 |
| 8.3      | 2,54               | 2,46-2,62 | 1,56     | 0,62 | 0,23               | 0,22-0,24 | 1,73     | 7,51 |
| 8.4      | 2,58               | 2,52-2,64 | 1,45     | 0,56 | 0,20               | 0,19-0,21 | 1,77     | 8,92 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

**Figura 31** – Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na fase II do estudo

**Fonte:** O autor.

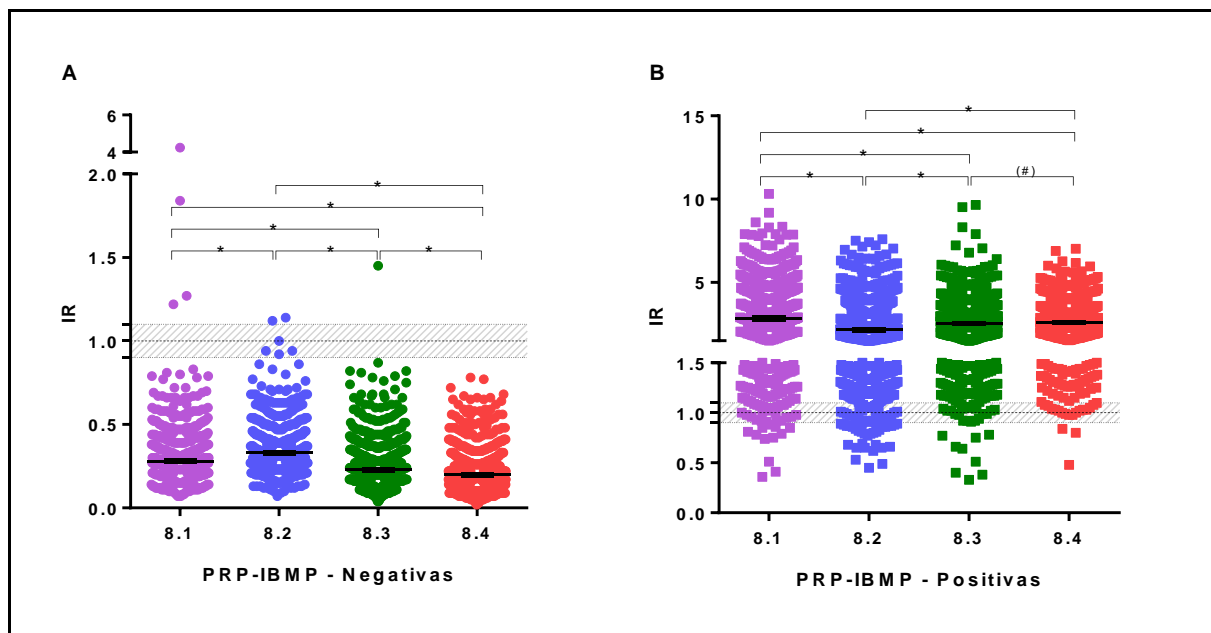
**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3; (D) PRP-IBMP-8.4. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ( $CO \pm 10\%$ ).

**Legenda:** IR (índice de reatividade).

A análise das quatro moléculas utilizando os IR médios das amostras negativas mostrou não haver sobreposição dos IC95% dentre elas. Além do mais, a avaliação estatística revelou diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ ) (Figura 32A). Resultados semelhantes foram encontrados para as amostras positivas, com exceção para as moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4 ( $p=0,4160$ ) (Figura 32B). Ademais, também foi avaliada a sobreposição dos

IC95% para os valores de sensibilidade e especificidade. Dentre os IC95% analisados, a sensibilidade do PRP-IBMP-8.2 apresentou o menor IC95%, não se sobrepondo com aquele calculado para as demais moléculas. Não foi também observada sobreposição entre o IC95% dos PRP-IBMP-8.1 e 8.4 (Figura 33). Quanto à especificidade foi demonstrada sobreposição entre os IC95% para todas as moléculas (Figura 33).

**Figura 32** – Análise gráfica da comparação dos índices de reatividade de amostras negativas e positivas para os PRP-IBMP na fase II do estudo

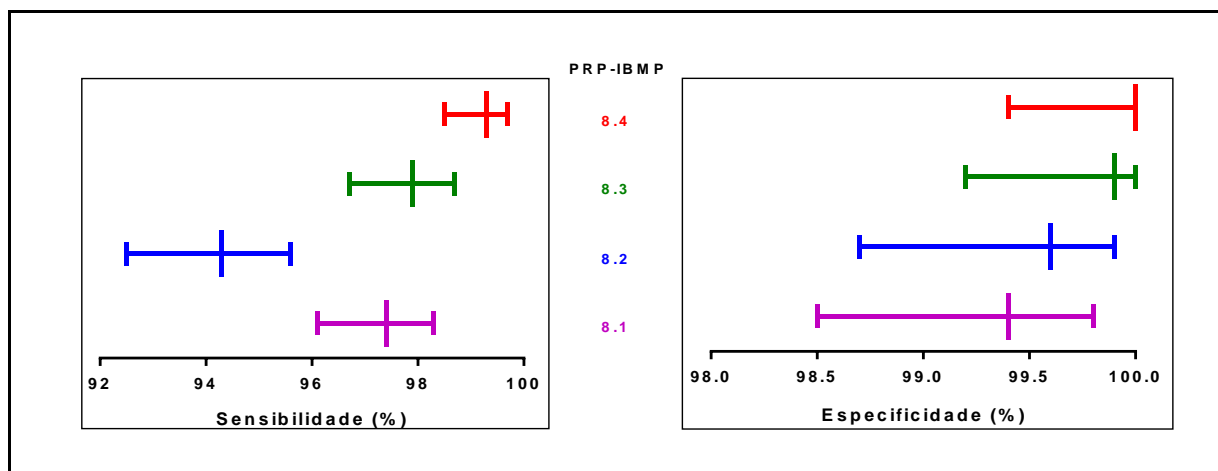


**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) Amostras negativas; (B) Amostras positivas. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ( $CO \pm 10\%$ ). \* ( $p < 0,0001$ ); (#)  $p = 0,4160$ . Os símbolos expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de T de Student.

**Legenda:** IR (índice de reatividade).

**Figura 33** – Análise gráfica da comparação dos intervalos de confiança a 95% da sensibilidade e especificidade dos PRP-IBMP na fase II do estudo



**Fonte:** O autor.

**Legenda:** IC (intervalo de confiança).

A correlação entre os resultados obtidos para cada um dos PRP foi avaliada pelo método de Spearman, mostrando resultados acima de 0,81 para todas as possibilidades testadas, como resumido na Tabela 25.

**Tabela 25** - Correlação entre os PRP-IBMP na fase II do estudo

| PRP IBMP | 8.2  |             | 8.3  |             | 8.4  |             |
|----------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|
|          | r    | IC95%       | r    | IC95%       | r    | IC95%       |
| 8.1      | 0,87 | (0,86-0,88) | 0,81 | (0,80-0,83) | 0,87 | (0,86-0,89) |
| 8.2      | -    | -           | 0,84 | (0,83-0,86) | 0,87 | (0,86-0,88) |
| 8.3      | -    | -           | -    | -           | 0,85 | (0,83-0,86) |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** IC (intervalo de confiança); r (correlação de Spearman).

Conforme descrito na Tabela 26, os IR estratificados por origem região geográfica foram descritos com objetivo de verificação da magnitude de resposta aos antígenos PRP-IBMP por indivíduos infectados provenientes de diferentes localidades do Brasil e de alguns países da América Latina e Estados Unidos (painéis internacionais). A análise gráfica destes dados encontra-se disposta na Figura 34.



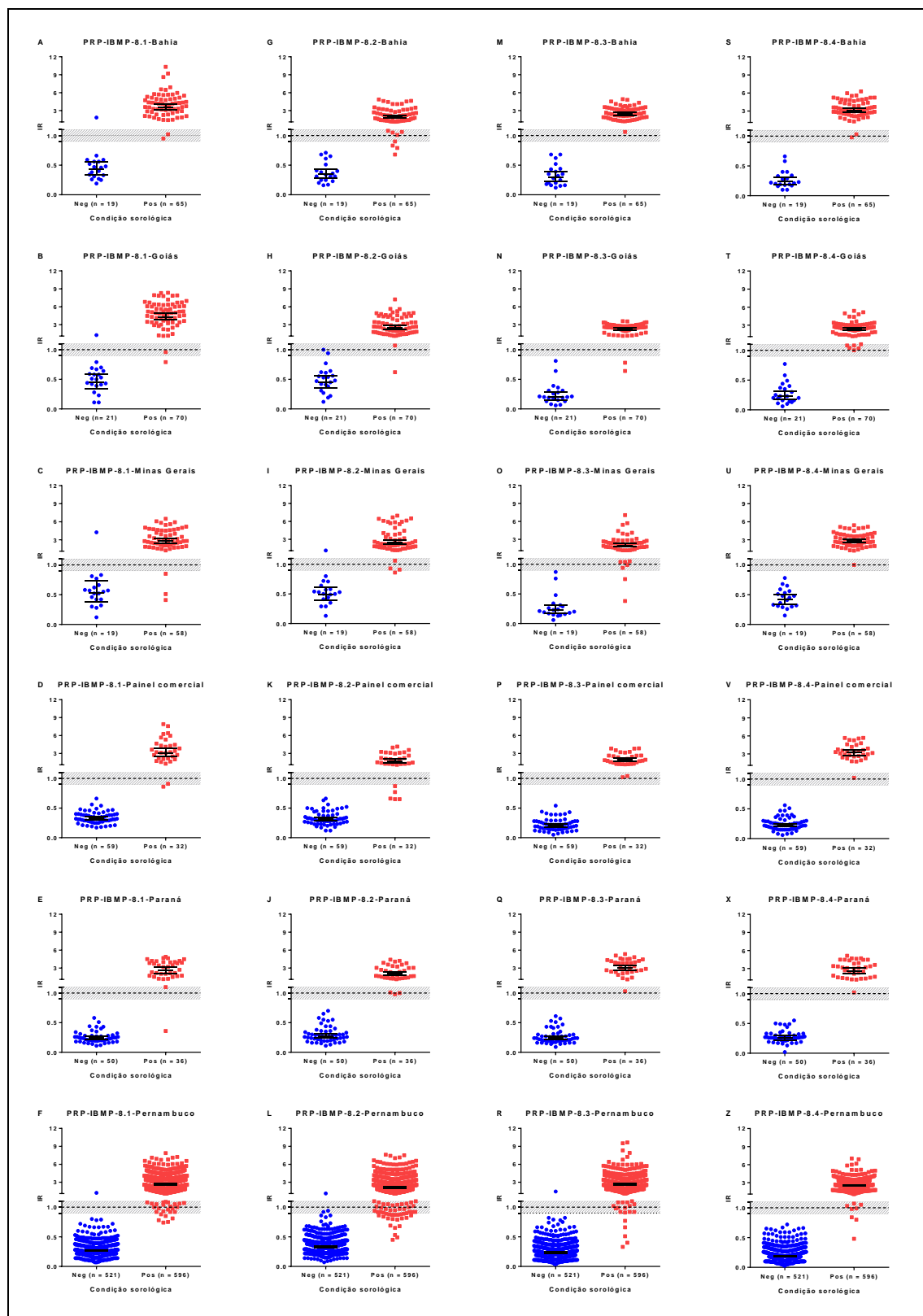
**Tabela 26** - Parâmetros de desempenho do PRP-IBMP estratificados por origem ou região geográfica na fase II do estudo

|        | PRP<br>IBMP | AUC<br>(IC95%)   | Sen (%)<br>(IC95%) | Esp (%)<br>(IC95%) | Exa (%)<br>(IC95%) | J (%) |
|--------|-------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| BA     | 8.1         | 0,99 (0,98-1,00) | 98,5 (91,8-99,7)   | 94,7 (75,4-99,1)   | 97,6 (91,7-99,3)   | 93,2  |
|        | 8.2         | 0,99 (0,99-1,00) | 93,8 (85,2-97,6)   | 100 (83,2-100)     | 95,2 (88,4-98,1)   | 93,8  |
|        | 8.3         | 1,00             | 100 (94,4-100)     | 100 (83,2-100)     | 100 (95,6-100)     | 100   |
|        | 8.4         | 0,99 (0,99-1,00) | 98,5 (91,8-99,7)   | 100 (83,2-100)     | 98,8 (93,6-99,8)   | 98,5  |
| GO     | 8.1         | 0,99 (0,99-1,00) | 97,1 (90,2-99,2)   | 95,2 (77,3-99,2)   | 96,7 (90,8-98,9)   | 92,4  |
|        | 8.2         | 0,99 (0,99-1,00) | 98,6 (92,3-99,7)   | 95,2 (77,3-99,2)   | 97,8 (92,3-99,4)   | 93,8  |
|        | 8.3         | 0,99 (0,99-1,00) | 97,1 (90,2-99,2)   | 100 (84,5-100)     | 97,8 (92,3-99,4)   | 97,1  |
|        | 8.4         | 1,00             | 100 (94,8-100)     | 100 (84,5-100)     | 100 (95,9-100)     | 100   |
| MG     | 8.1         | 0,94 (0,86-1,00) | 94,8 (85,9-98,2)   | 94,7 (75,4-99,1)   | 94,8 (87,4-98,0)   | 89,6  |
|        | 8.2         | 0,99 (0,99-1,00) | 94,8 (85,9-98,2)   | 94,7 (75,4-99,1)   | 94,8 (87,4-98,0)   | 89,6  |
|        | 8.3         | 0,99 (0,99-1,00) | 93,1 (83,6-97,3)   | 100 (83,2-100)     | 94,8 (87,4-98,0)   | 93,1  |
|        | 8.4         | 1,00             | 100 (93,8-100)     | 100 (83,2-100)     | 100 (95,2-100)     | 100   |
| PAINEL | 8.1         | 1,00             | 93,8 (79,9-98,3)   | 100 (93,9-100)     | 97,8 (92,3-99,4)   | 93,8  |
|        | 8.2         | 0,99 (0,99-1,00) | 84,4 (68,2-93,1)   | 100 (93,9-100)     | 94,5 (87,8-97,6)   | 84,4  |
|        | 8.3         | 1,00             | 100 (89,3-100)     | 100 (93,9-100)     | 100 (95,9-100)     | 100   |
|        | 8.4         | 1,00             | 100 (89,3-100)     | 100 (93,9-100)     | 100 (95,9-100)     | 100   |
| PR     | 8.1         | 0,99 (0,99-1,00) | 97,2 (85,8-99,5)   | 100 (92,9-100)     | 98,8 (93,7-99,8)   | 97,2  |
|        | 8.2         | 0,99 (0,99-1,00) | 97,2 (85,8-99,5)   | 100 (92,9-100)     | 98,8 (93,7-99,8)   | 97,2  |
|        | 8.3         | 1,00             | 100 (90,4-100)     | 100 (92,9-100)     | 100 (95,7-100)     | 100   |
|        | 8.4         | 1,00             | 100 (90,4-100)     | 100 (92,9-100)     | 100 (95,7-100)     | 100   |
| PE     | 8.1         | 0,99 (0,99-1,00) | 97,8 (96,3-98,7)   | 99,8 (98,9-100)    | 98,7 (97,9-99,3)   | 97,6  |
|        | 8.2         | 0,99 (0,99-1,00) | 94,1 (91,9-95,7)   | 99,8 (98,9-100)    | 96,8 (95,6-97,7)   | 93,9  |
|        | 8.3         | 0,99 (0,99-1,00) | 98,0 (96,5-98,8)   | 99,8 (98,9-100)    | 98,8 (98,0-99,3)   | 97,8  |
|        | 8.4         | 0,99 (0,99-1,00) | 99,2 (98,1-99,6)   | 100 (99,3-100)     | 99,6 (99,0-99,8)   | 99,2  |

Fonte: O autor.

Legenda: AUC (área abaixo da curva); Esp (especificidade); Exa (exatidão); IC (intervalo de confiança); J (índice de Youden); Sen (sensibilidade).

**Figura 34** – Análise gráfica dos índices de reatividade estratificados por região geográfica utilizando os PRP-IBMP na fase II do estudo



**Fonte:** O autor. **Nota:** (A-F) PRP-IBMP-8.1; (G-L) PRP-IBMP-8.2; (M-R) PRP-IBMP-8.3; (S-T) PRP-IBMP-8.4. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ( $CO \pm 10\%$ ). **Legenda:** IR (índice de reatividade).

---

### 7.6.3 Sinergia entre os PRP-IBMP: misturas equimolares

A avaliação da sinergia entre os PRP-IBMP em misturas equimolares foi conduzida com a utilização de 46 amostras positivas e 46 negativas para a doença de Chagas. As quantidades em massa molar e em gramas dos PRP-IBMP utilizados nesta investigação estão descritas na Tabela 27. No momento inicial as moléculas foram avaliadas isoladamente e, posteriormente, em misturas contendo dois, três ou quatro antígenos. A Tabela 27 também descreve os parâmetros de desempenho determinados para cada uma das condições testadas.

**Tabela 27** - Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP utilizando misturas equimolares

| PRP<br>IBMP | nM   | ng   | AUC<br>IC95% | Sen (%)<br>IC95%    | Esp (%)<br>IC95%    | Exa (%)<br>IC95%    | J (%) |
|-------------|------|------|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|
| 8.1         | 21,2 | 25,0 | 1,00         | 100<br>(92,3-100)   | 100<br>(92,3-100)   | 100<br>(96,0-100)   | 100   |
| 8.2         | 4,8  | 12,5 | 1,00         | 100<br>(92,3-100)   | 100<br>(92,3-100)   | 100<br>(96,0-100)   | 100   |
| 8.3         | 11,9 | 25,0 | 1,00         | 100<br>(92,3-100)   | 100<br>(92,3-100)   | 100<br>(96,0-100)   | 100   |
| 8.4         | 7,8  | 25,0 | 1,00         | 100<br>(92,3-100)   | 100<br>(92,3-100)   | 100<br>(96,0-100)   | 100   |
| 8.1         | 21,2 | 25,0 | 0,99         | 95,7<br>(85,5-98,8) | 93,5<br>(82,5-97,8) | 94,6<br>(87,9-97,7) | 89,1  |
| 8.2         | 21,2 | 55,0 | (0,98-1,00)  | (85,5-98,8)         | (82,5-97,8)         | (87,9-97,7)         |       |
| 8.1         | 21,2 | 25,0 | 0,99         | 95,7<br>(85,5-98,8) | 95,7<br>(85,5-98,8) | 95,7<br>(89,3-98,3) | 91,3  |
| 8.3         | 21,2 | 44,1 | (0,98-1,00)  | (85,5-98,8)         | (85,5-98,8)         | (89,3-98,3)         |       |
| 8.1         | 21,2 | 25,0 | 0,99         | 100<br>(92,3-100)   | 95,7<br>(85,5-98,8) | 97,8<br>(92,4-99,4) | 95,7  |
| 8.4         | 21,2 | 68,1 | (0,99-1,00)  | (92,3-100)          | (85,5-98,8)         | (92,4-99,4)         |       |
| 8.2         | 11,9 | 31,4 | 0,99         | 93,5<br>(82,5-97,8) | 97,8<br>(88,7-99,6) | 95,7<br>(89,3-98,3) | 91,3  |
| 8.3         | 11,9 | 25,0 | (0,98-1,00)  | (82,5-97,8)         | (88,7-99,6)         | (89,3-98,3)         |       |
| 8.2         | 7,8  | 20,4 | 0,99         | 100<br>(92,3-100)   | 97,8<br>(88,7-99,6) | 98,9<br>(94,1-99,8) | 97,8  |
| 8.4         | 7,8  | 25,0 | (0,99-1,00)  | (92,3-100)          | (88,7-99,6)         | (94,1-99,8)         |       |
| 8.3         | 11,9 | 25,0 | 0,99         | 97,8<br>(88,7-99,6) | 100<br>(92,3-100)   | 98,9<br>(94,1-99,8) | 97,8  |
| 8.4         | 11,9 | 38,0 | (0,99-1,00)  | (88,7-99,6)         | (92,3-100)          | (94,1-99,8)         |       |
| 8.1         | 21,2 | 25,0 | 0,99         | 95,7<br>(85,5-98,8) | 100<br>(92,3-100)   | 97,8<br>(92,4-99,4) | 95,7  |
| 8.2         | 21,2 | 55,8 | (0,98-1,00)  | (85,5-98,8)         | (92,3-100)          | (92,4-99,4)         |       |
| 8.3         | 21,2 | 44,1 |              |                     |                     |                     |       |
| 8.1         | 21,2 | 25,0 | 0,99         | 100<br>(92,3-100)   | 93,5<br>(82,5-97,8) | 96,7<br>(90,8-98,9) | 93,5  |
| 8.2         | 21,2 | 55,8 | (0,99-1,00)  | (92,3-100)          | (82,5-97,8)         | (90,8-98,9)         |       |
| 8.4         | 21,2 | 68,1 |              |                     |                     |                     |       |
| 8.1         | 21,2 | 25,0 | 0,99         | 97,8<br>(88,7-99,6) | 97,8<br>(88,7-99,6) | 97,8<br>(92,4-99,4) | 95,7  |
| 8.3         | 21,2 | 44,1 | (0,99-1,00)  | (88,7-99,6)         | (88,7-99,6)         | (92,4-99,4)         |       |
| 8.4         | 21,2 | 68,1 |              |                     |                     |                     |       |
| 8.2         | 11,9 | 31,4 | 0,97         | 97,8<br>(88,7-99,6) | 89,1<br>(77,0-95,3) | 93,5<br>(86,5-97,0) | 87,0  |
| 8.3         | 11,9 | 25,0 | (0,93-1,00)  | (88,7-99,6)         | (77,0-95,3)         | (86,5-97,0)         |       |
| 8.4         | 11,9 | 38,0 |              |                     |                     |                     |       |
| 8.1         | 21,2 | 25,0 | 0,99         | 95,7<br>(85,5-98,8) | 100<br>(92,3-100)   | 97,8<br>(92,4-99,4) | 95,7  |
| 8.2         | 21,2 | 55,8 | (0,99-1,00)  | (85,5-98,8)         | (92,3-100)          | (92,4-99,4)         |       |
| 8.3         | 21,2 | 44,1 |              |                     |                     |                     |       |
| 8.4         | 21,2 | 68,1 |              |                     |                     |                     |       |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** AUC (área abaixo da curva); Esp (especificidade); Exa (exatidão); J (índice de Youden); Sen (sensibilidade).

Os valores médios dos IR calculados para as amostras positivas e negativas estão expostos na Tabela 28 e as representações gráficas destes dados na Figura 35.

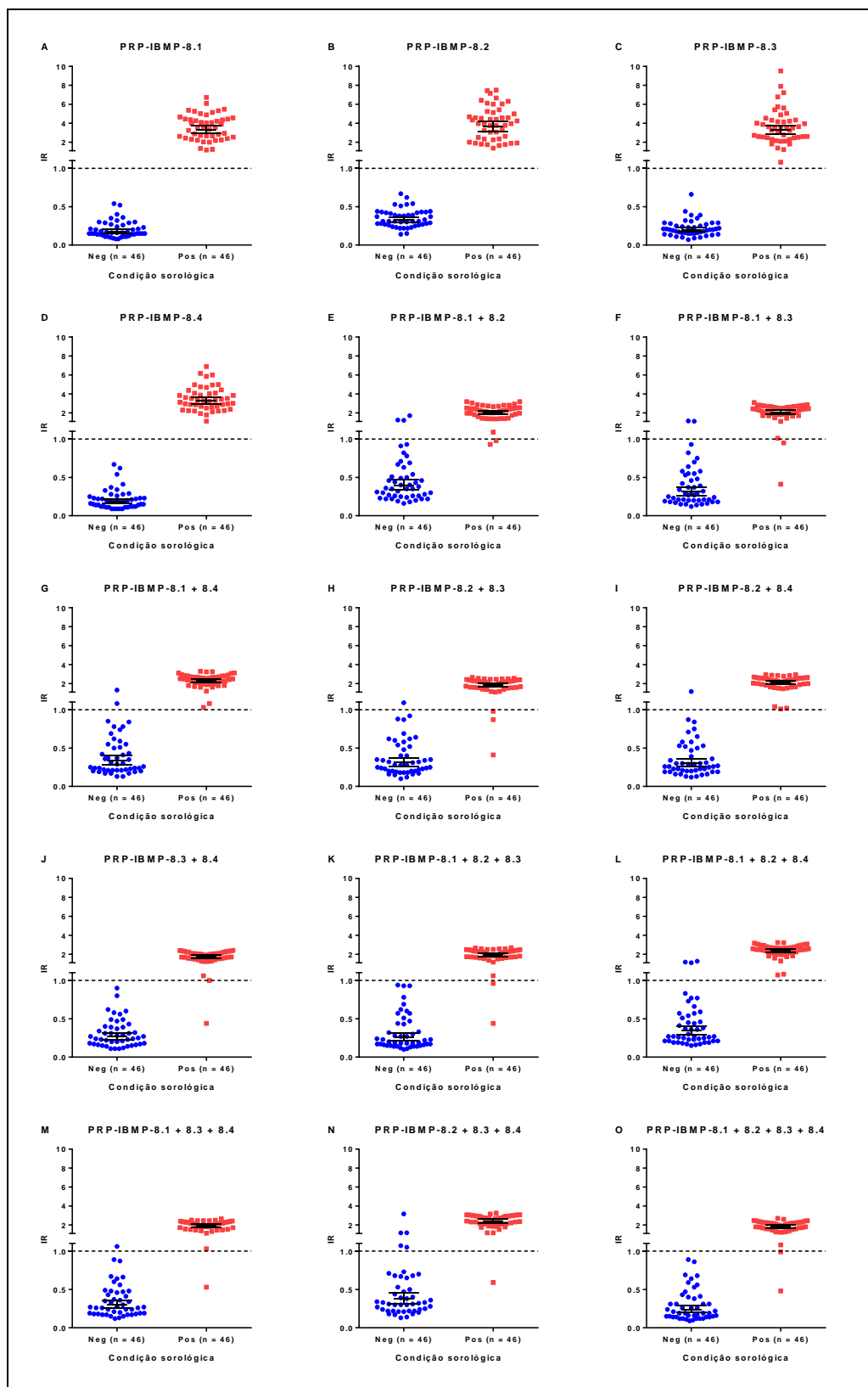
**Tabela 28** - Índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando misturas equimolares

| PRP<br>IBMP            | AMOSTRAS POSITIVAS |           |          |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |          |      |
|------------------------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
|                        | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   |
| <b>8.1</b>             | 3,33               | 2,95-3,77 | 1,51     | 0,45 | 0,18               | 0,16-0,21 | 1,60     | 8,92 |
| <b>8.2</b>             | 3,64               | 3,16-4,18 | 1,60     | 0,44 | 0,33               | 0,30-0,37 | 1,40     | 4,23 |
| <b>8.3</b>             | 3,29               | 2,86-3,78 | 1,60     | 0,49 | 0,20               | 0,17-0,23 | 1,55     | 7,81 |
| <b>8.4</b>             | 3,28               | 2,95-3,66 | 1,44     | 0,44 | 0,19               | 0,16-0,22 | 1,68     | 9,02 |
| <b>8.1+8.2</b>         | 2,03               | 1,85-2,23 | 1,37     | 0,67 | 0,40               | 0,34-0,47 | 1,75     | 4,42 |
| <b>8.1+8.3</b>         | 2,05               | 1,84-2,28 | 1,44     | 0,70 | 0,31               | 0,26-0,37 | 1,82     | 5,83 |
| <b>8.1+8.4</b>         | 2,30               | 2,12-2,50 | 1,32     | 0,57 | 0,34               | 0,28-0,40 | 1,80     | 5,35 |
| <b>8.2+8.3</b>         | 1,83               | 1,65-2,04 | 1,43     | 0,78 | 0,31               | 0,26-0,37 | 1,79     | 5,74 |
| <b>8.2+8.4</b>         | 2,13               | 1,96-2,31 | 1,32     | 0,62 | 0,30               | 0,25-0,36 | 1,76     | 5,85 |
| <b>8.3+8.4</b>         | 1,75               | 1,60-1,92 | 1,36     | 0,78 | 0,27               | 0,23-0,31 | 1,72     | 6,40 |
| <b>8.1+8.2+8.3</b>     | 1,93               | 1,75-2,13 | 1,39     | 0,72 | 0,26               | 0,21-0,31 | 1,89     | 7,29 |
| <b>8.1+8.2+8.4</b>     | 2,35               | 2,18-2,54 | 1,30     | 0,55 | 0,34               | 0,29-0,41 | 1,79     | 5,23 |
| <b>8.1+8.3+8.4</b>     | 1,89               | 1,74-2,06 | 1,34     | 0,71 | 0,30               | 0,26-0,36 | 1,74     | 5,76 |
| <b>8.2+8.3+8.4</b>     | 2,38               | 2,16-2,62 | 1,38     | 0,58 | 0,38               | 0,31-0,46 | 1,92     | 5,12 |
| <b>8.1+8.2+8.3+8.4</b> | 1,82               | 1,66-2,00 | 1,37     | 0,75 | 0,24               | 0,20-0,29 | 1,88     | 7,86 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

**Figura 35** – Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando misturas equimolares



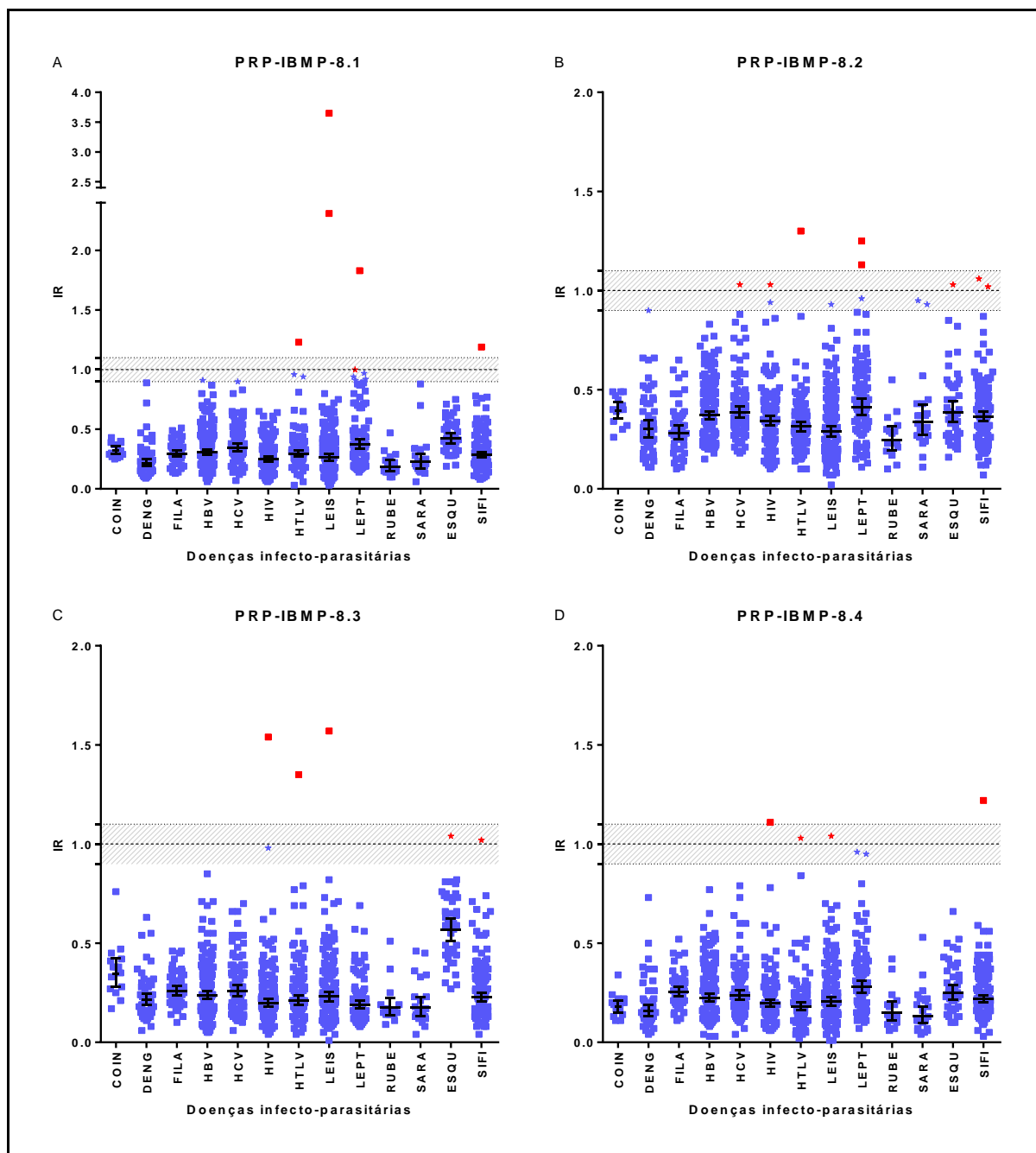
**Fonte:** O autor. **Nota:** Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ( $CO \pm 10\%$ ). **Legenda:** IR (índice de reatividade).

---

#### 7.6.4 Reações cruzadas

A avaliação gráfica das reações cruzadas está descrita na Figura 36. Os pontos em vermelho representam as reações cruzadas utilizando os PRP-IBMP. Desta maneira, das 1079 amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias, foi observada reatividade para 0,46% (5/1079) para o PRP-IBMP-8.1 (leptospirose: 2; HTLV: 1; leishmaniose: 2) (Figura 35A), 0,85% (8/1079) para o PRP-IBMP-8.2 (leptospirose: 2; sífilis: 2; HCV: 1; HIV: 1; HTLV: 1 e esquistossomose: 1) (Figura 35B), 0,46% (5/1079) para o PRP-IBMP-8.3 (HIV: 1; HTLV: 1; sífilis: 1; leishmaniose: 1 e esquistossomose: 1) (Figura 35C) e 0,37% (4/1079) para o PRP-IBMP-8.4 (HIV:1, HTLV: 1, leishmaniose: 1 e sífilis: 1) (Figura 35D). Ao considerar a faixa do CO  $\pm$  10% como a zona cinza foi observado que 0,74% (8/1079) das amostras apresentaram resultados inconclusivos para o PRP-IBMP-8.1, 1,01% (11/1079) para o PRP-IBMP-8.2, 0,28% (3/1079) para o PRP-IBMP-8.3 e 0,37% (4/1079) para o PRP-IBMP-8.4. Esta condição encontra-se representada na Figura 36 com o símbolo de estrela.

**Figura 36** – Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando amostras séricas de indivíduos portadores de doenças infecto-parasitárias



**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3; (D) PRP-IBMP-8.4. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ( $CO \pm 10\%$ ). Reatividade cruzada é representada pela coloração em vermelho e resultados inconclusivos pelo símbolo estrela. Co-infecções conforme descritas na Tabela 20.

**Legenda:** COIN (co-infecção); DENG (dengue); ESQU (esquistossomose); FILA (filariose); HBV (vírus da hepatite B); HCV (vírus da hepatite C), HIV (vírus da imunodeficiência humana), HTLV (vírus linfotrófico de células T humanas); IR (índice de reatividade); LEIS (leishmaniose); LEPT (leptospirose); RUBE (rubéola); SARA (sarampo); SIFI (sífilis).



A análise do IR para o PRP-IBMP-8.1 revelou valores variando de 0,19 para rubéola até 0,42 para esquistossomose. Para o PRP-IBMP-8.2 o valor mínimo encontrado foi de 0,25 para rubéola e 0,41 para a leptospirose. Quanto ao antígeno IBMP-8.3, o menor valor demonstrado foi de 0,17 para rubéola e sarampo e o maior de 0,57 para esquistossomose. E, para o PRP-IBMP-8.4, o menor valor ficou por conta do sarampo (0,13) e o maior para a leptospirose (0,28) (Tabela 29).

**Tabela 29** - Índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias

| Morbidades   | PRP-IBMP-8.1 |           | PRP-IBMP-8.2 |           | PRP-IBMP-8.3 |           | PRP-IBMP-8.4 |           |
|--------------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|
|              | IR           | IC95%     | IR           | IC95%     | IR           | IC95%     | IR           | IC95%     |
| Co-infecções | 0,36         | 0,32-0,41 | 0,40         | 0,37-0,44 | 0,27         | 0,22-0,34 | 0,21         | 0,18-0,25 |
| Dengue       | 0,22         | 0,19-0,25 | 0,30         | 0,26-0,35 | 0,21         | 0,19-0,25 | 0,16         | 0,13-0,19 |
| Esquis       | 0,42         | 0,38-0,47 | 0,39         | 0,34-0,44 | 0,57         | 0,51-0,62 | 0,25         | 0,21-0,29 |
| Filariose    | 0,29         | 0,27-0,32 | 0,28         | 0,25-0,32 | 0,26         | 0,24-0,28 | 0,25         | 0,23-0,28 |
| HBV          | 0,31         | 0,29-0,33 | 0,37         | 0,35-0,39 | 0,24         | 0,22-0,26 | 0,22         | 0,21-0,25 |
| HCV          | 0,34         | 0,31-0,37 | 0,38         | 0,35-0,41 | 0,27         | 0,24-0,30 | 0,24         | 0,21-0,26 |
| HIV          | 0,25         | 0,23-0,27 | 0,34         | 0,32-0,37 | 0,20         | 0,18-0,22 | 0,20         | 0,18-0,21 |
| HTLV         | 0,30         | 0,27-0,32 | 0,31         | 0,29-0,34 | 0,21         | 0,19-0,24 | 0,18         | 0,16-0,20 |
| Leishmaniose | 0,26         | 0,24-0,29 | 0,29         | 0,26-0,32 | 0,23         | 0,21-0,26 | 0,20         | 0,18-0,23 |
| Leptospirose | 0,38         | 0,34-0,42 | 0,41         | 0,37-0,46 | 0,19         | 0,17-0,21 | 0,28         | 0,25-0,31 |
| Rubéola      | 0,19         | 0,15-0,24 | 0,25         | 0,19-0,31 | 0,17         | 0,14-0,22 | 0,15         | 0,11-0,21 |
| Sarampo      | 0,23         | 0,18-0,29 | 0,34         | 0,27-0,42 | 0,17         | 0,13-0,23 | 0,13         | 0,10-0,18 |
| Sífilis      | 0,28         | 0,26-0,31 | 0,36         | 0,34-0,39 | 0,23         | 0,21-0,25 | 0,22         | 0,20-0,24 |

**Fonte:** O autor.

**Nota:** Co-infecções conforme descritas na Tabela 20.

**Legenda:** Esquis (esquistossomose); HBV (vírus da hepatite B); HCV (vírus da hepatite C), HIV (vírus da imunodeficiência humana), HTLV (vírus linfotrófico de células T humanas); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

## 7.6.5 Reprodutibilidade

### 7.6.5.1 Intraplaca (Repetitividade)

A avaliação da reprodutibilidade intraplaca mostrou valores elevados para os parâmetros de desempenho investigados (Tabela 30). A avaliação dos IC95% revelou existir sobreposição dos parâmetros entre a primeira e a segunda determinação.

**Tabela 30** - Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade intraplaca

| PRP<br>IBMP | DETERM | AUC<br>(IC95%)   | Sen (%)<br>(IC95%) | Esp (%)<br>(IC95%) | Exa (%)<br>(IC95%) | J (%) |
|-------------|--------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| 8.1         | 1      | 1,00             | 95,7 (79,0-99,2)   | 100 (85,7-100)     | 97,8 (88,7-99,6)   | 95,7  |
|             | 2      | 1,00             | 100 (85,7-100)     | 100 (85,7-100)     | 100 (92,3-100)     | 100   |
| 8.2         | 1      | 0,99 (0,99-1,00) | 91,3 (73,2-97,6)   | 100 (85,7-100)     | 95,7 (85,5-98,8)   | 91,3  |
|             | 2      | 1,00             | 87,0 (67,9-95,5)   | 100 (85,7-100)     | 93,5 (82,5-97,8)   | 87,0  |
| 8.3         | 1      | 0,99 (0,99-1,00) | 95,7 (79,0-99,2)   | 95,7 (79,0-99,2)   | 95,7 (85,5-98,8)   | 91,3  |
|             | 2      | 0,99 (0,98-1,00) | 95,7 (79,0-99,2)   | 95,7 (79,0-99,2)   | 95,7 (85,5-98,8)   | 91,3  |
| 8.4         | 1      | 0,99 (0,99-1,00) | 95,7 (79,0-99,2)   | 100 (85,7-100)     | 97,8 (88,7-99,6)   | 95,7  |
|             | 2      | 1,00             | 100 (85,7-100)     | 100 (85,7-100)     | 100 (92,3-100)     | 100   |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** AUC (área abaixo da curva); DETERM (determinação); Esp (especificidade); Exa (exatidão); J (índice de Younden); Sen (sensibilidade).

Os índices médios de reatividade estão expostos na Tabela 31 e as representações gráficas com os respectivos valores de significância estatística na Figura 37.

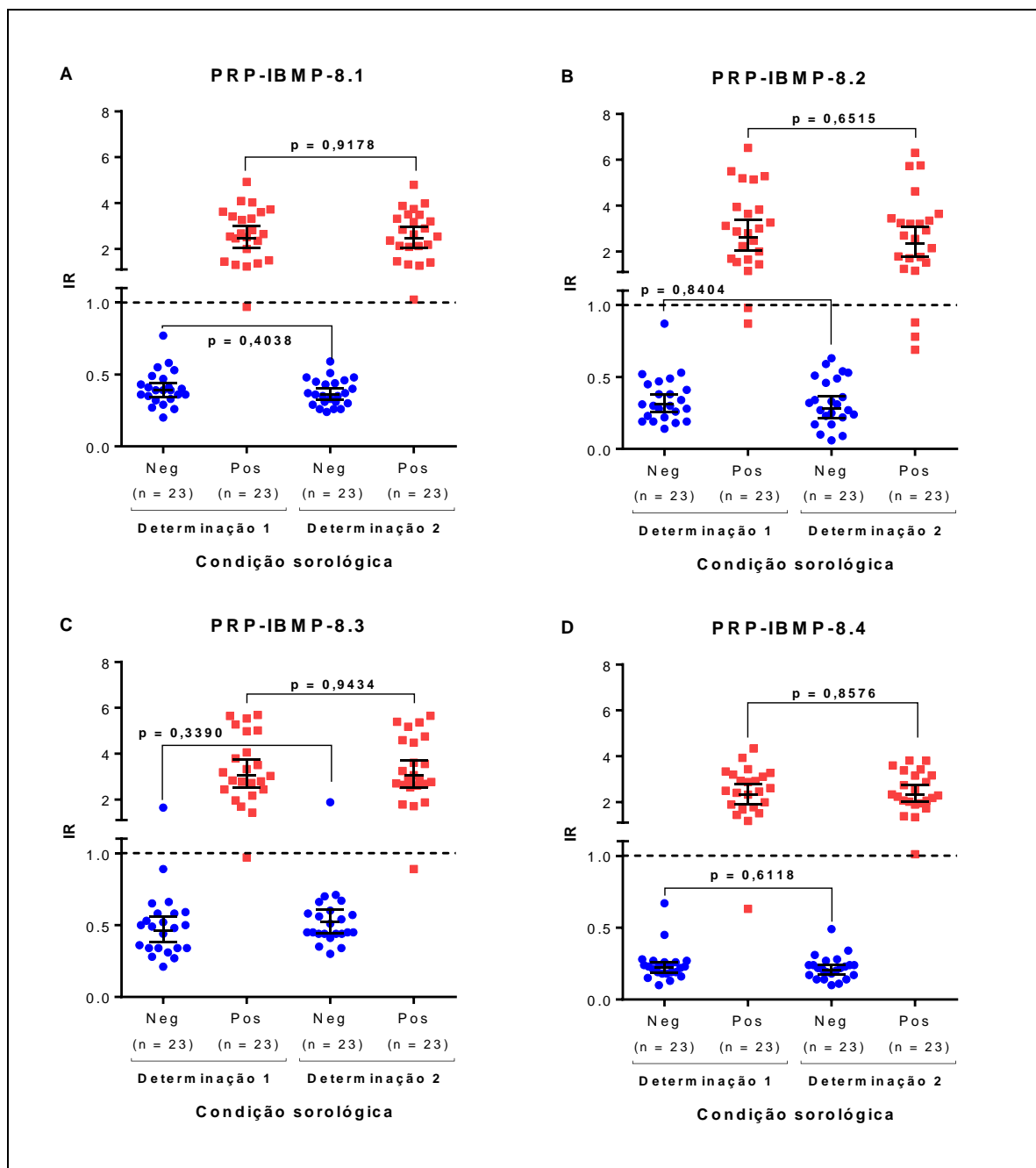
**Tabela 31** - Índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade intraplaca

| PRP<br>IBMP | DETERM | AMOSTRAS POSITIVAS |           |          |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |          |      |
|-------------|--------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
|             |        | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   |
| 8.1         | 1      | 2,46               | 2,03-2,99 | 1,56     | 0,64 | 0,39               | 0,34-0,44 | 1,34     | 3,44 |
|             | 2      | 2,47               | 2,06-2,96 | 1,52     | 0,61 | 0,36               | 0,33-0,40 | 1,28     | 3,53 |
| 8.2         | 1      | 2,63               | 2,50-3,37 | 1,78     | 0,68 | 0,31               | 0,26-0,38 | 1,55     | 4,97 |
|             | 2      | 2,34               | 1,78-3,08 | 1,89     | 0,81 | 0,28               | 0,21-0,36 | 1,87     | 6,73 |
| 8.3         | 1      | 3,05               | 2,05-3,73 | 1,59     | 0,52 | 0,46               | 0,38-0,56 | 1,55     | 3,35 |
|             | 2      | 3,06               | 2,53-3,71 | 1,56     | 0,51 | 0,52               | 0,44-0,61 | 1,44     | 2,78 |
| 8.4         | 1      | 2,32               | 1,92-2,80 | 1,55     | 0,67 | 0,22               | 0,19-0,26 | 1,48     | 6,67 |
|             | 2      | 2,34               | 2,01-2,73 | 1,42     | 0,61 | 0,21               | 0,18-0,24 | 1,43     | 6,91 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); DETERM (determinação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

**Figura 37** – Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação da reprodutibilidade intraplaca



**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3; (D) PRP-IBMP-8.4. Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Wilcoxon. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas.

**Legenda:** IR (índice de reatividade).

A análise comparativa das determinações foi realizada através da determinação do índice de Kappa de Cohen e pela correlação de Spearman. Ambos os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 32.

**Tabela 32** - Concordância qualitativa e correlação de Spearman dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade intraplaca

| PRP<br>IBMP | Kappa de Cohen |             |                | Correlação de Spearman |             |         |
|-------------|----------------|-------------|----------------|------------------------|-------------|---------|
|             | $\kappa$       | IC95%       | Concordância   | r                      | IC95%       | p       |
| <b>8.1</b>  | 0,96           | (0,87-1,00) | Quase perfeita | 0,93                   | (0,88-0,96) | <0,0001 |
| <b>8.2</b>  | 0,87           | (0,73-1,00) | Quase perfeita | 0,88                   | (0,79-0,93) | <0,0001 |
| <b>8.3</b>  | 1,00           | -           | Perfeita       | 0,91                   | (0,84-0,95) | <0,0001 |
| <b>8.4</b>  | 0,96           | (0,87-1,00) | Quase perfeita | 0,94                   | (0,89-0,97) | <0,0001 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** IC (intervalo de confiança);  $\kappa$  (índice de Kappa de Cohen); r (correlação de Spearman).

### 7.6.5.2 Entre lotes

Os parâmetros de desempenho obtidos a partir da comparação entre lotes estão expostos na Tabela 33.

**Tabela 33** - Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre lotes

| PRP<br>IBMP | Lote | AUC<br>(IC95%)   | Sen (%)<br>(IC95%) | Esp (%)<br>(IC95%) | Exa (%)<br>(IC95%) | J (%) |
|-------------|------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| <b>8.1</b>  | 1    | 1,00             | 100 (92,1-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (95,9-100)     | 100   |
|             | 2    | 1,00             | 100 (92,1-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (95,9-100)     | 100   |
| <b>8.2</b>  | 1    | 1,00             | 100 (92,1-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (95,9-100)     | 100   |
|             | 2    | 0,99 (0,99-1,00) | 97,8 (88,4-99,6)   | 100 (92,3-100)     | 98,9 (94,0-99,8)   | 97,8  |
| <b>8.3</b>  | 1    | 1,00             | 100 (92,1-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (95,9-100)     | 100   |
|             | 2    | 0,99 (0,99-1,00) | 97,8 (88,4-99,6)   | 97,8 (88,7-99,6)   | 97,8 (92,3-99,4)   | 95,6  |
| <b>8.4</b>  | 1    | 1,00             | 100 (92,1-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (95,9-100)     | 100   |
|             | 2    | 0,99 (0,99-1,00) | 95,6 (85,2-98,8)   | 95,7 (85,5-98,8)   | 95,6 (89,2-98,3)   | 91,2  |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** AUC (área abaixo da curva); Esp (especificidade); Exa (exatidão); J (índice de Youden); Sen (sensibilidade).

Para a análise dos IR entre os dois lotes avaliados foi construída a Tabela 34. As análises gráficas contendo o cálculo da significância estatística estão representadas na Figura 38.

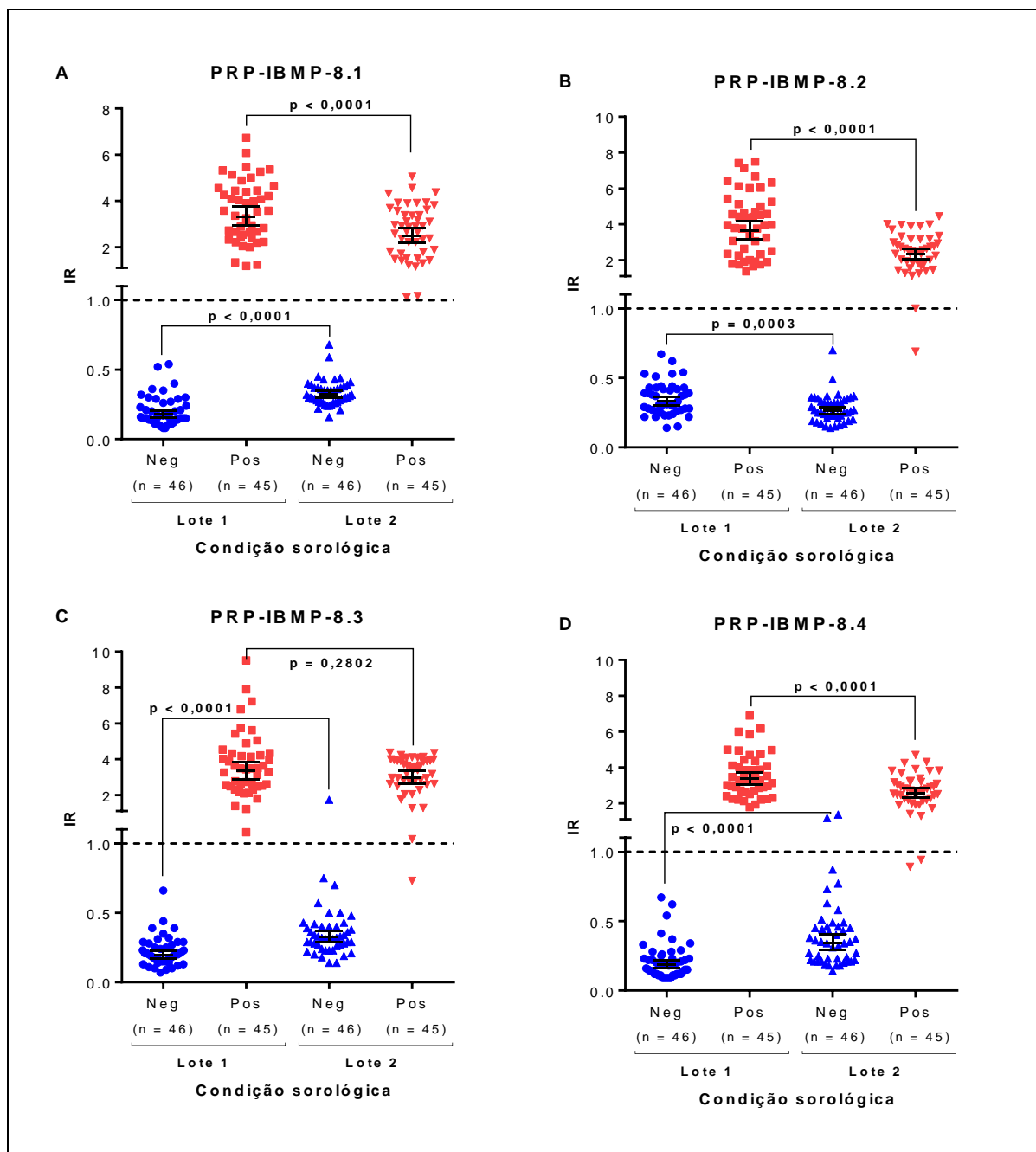
**Tabela 34** - Índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre lotes

| PRP<br>IBMP | Lote | AMOSTRAS POSITIVAS |           |          |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |          |      |
|-------------|------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
|             |      | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   |
| 8.1         | 1    | 3,31               | 2,92-3,75 | 1,52     | 0,46 | 0,18               | 0,16-0,21 | 1,60     | 8,92 |
|             | 2    | 2,50               | 2,19-2,85 | 1,55     | 0,62 | 0,32               | 0,30-0,35 | 1,30     | 4,05 |
| 8.2         | 1    | 3,62               | 3,14-4,18 | 1,61     | 0,44 | 0,33               | 0,30-0,37 | 1,40     | 4,23 |
|             | 2    | 2,32               | 2,04-2,63 | 1,52     | 0,65 | 0,26               | 0,24-0,29 | 1,39     | 5,28 |
| 8.3         | 1    | 3,33               | 2,90-3,83 | 1,59     | 0,48 | 0,20               | 0,17-0,23 | 1,55     | 7,81 |
|             | 2    | 2,98               | 2,64-3,37 | 1,50     | 0,50 | 0,33               | 0,29-0,37 | 1,55     | 4,75 |
| 8.4         | 1    | 3,36               | 3,04-3,71 | 1,39     | 0,41 | 0,19               | 0,16-0,22 | 1,68     | 9,02 |
|             | 2    | 2,57               | 2,31-2,87 | 1,43     | 0,56 | 0,34               | 0,29-0,40 | 1,68     | 4,89 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

**Figura 38** - Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação da reprodutibilidade entre lotes



**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3 (D); PRP-IBMP-8.4. Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Wilcoxon. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas.

**Legenda:** IR (índice de reatividade).

Conforme a Tabela 35, o grau de concordância qualitativo encontrado para o PRP-IBMP-8.1, 8.2, 8.3 e 8.4 foi de 100%, 98%, 96% e 91%, respectivamente, sendo considerado perfeito para o primeiro antígeno e quase perfeito para os demais. Já a avaliação da correlação

de Spearman entre os lotes exibiu valores de 0,83 para o PRP-IBMP-8.1, 0,88 para o antígeno IBMP-8.2, 0,84 para o PRP-IBMP-8.3 e 0,89 para o PRP-IBMP-8.4.

**Tabela 35** - Concordância qualitativa e correlação de Spearmann dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre lotes

| PRP<br>IBMP | Kappa de Cohen |             |                | Correlação de Spearman |             |         |
|-------------|----------------|-------------|----------------|------------------------|-------------|---------|
|             | $\kappa$       | IC95%       | Concordância   | r                      | IC95%       | p       |
| 8.1         | 1,00           | -           | Perfeita       | 0,83                   | (0,75-0,89) | <0,0001 |
| 8.2         | 0,98           | (0,94-1,00) | Quase perfeita | 0,88                   | (0,82-0,92) | <0,0001 |
| 8.3         | 0,96           | (0,90-1,00) | Quase perfeita | 0,84                   | (0,77-0,89) | <0,0001 |
| 8.4         | 0,91           | (0,83-1,00) | Quase perfeita | 0,89                   | (0,83-0,92) | <0,0001 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** IC (intervalo de confiança);  $\kappa$  (índice de Kappa de Cohen); r (correlação de Spearman).

### 7.6.5.3 Entre laboratórios

A reprodutibilidade entre laboratórios foi realizada com auxílio do LATED (Biomanguinhos, Fiocruz-RJ). Os resultados foram enviados ao SRDC e comparados com aqueles obtidos pelo nosso grupo. Os parâmetros de desempenho encontram-se descritos na Tabela 36 e a avaliação dos índices de reatividade na Tabela 37. A análise gráfica dos dados é apresentada na Figura 39.

**Tabela 36** - Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre laboratórios

| PRP<br>IBMP | OPER  | AUC<br>(IC95%)   | Sen (%)<br>(IC95%) | Esp (%)<br>(IC95%) | Exa (%)<br>(IC95%) | J (%) |
|-------------|-------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| 8.1         | SRDC  | 1,00             | 100 (90,8-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (95,6-100)     | 100   |
|             | LATED | 0,99 (0,97-1,00) | 94,7 (82,7-98,5)   | 100 (92,3-100)     | 97,6 (91,7-99,3)   | 94,7  |
| 8.2         | SRDC  | 100              | 100 (90,8-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (95,6-100)     | 100   |
|             | LATED | 0,98 (0,96-1,00) | 97,4 (86,5-99,5)   | 97,8 (88,7-99,6)   | 97,6 (91,7-99,3)   | 95,2  |
| 8.3         | SRDC  | 1,00             | 100 (90,8-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (95,6-100)     | 100   |
|             | LATED | 1,00             | 100 (90,8-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (95,6-100)     | 100   |
| 8.4         | SRDC  | 1,00             | 100 (90,8-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (95,6-100)     | 100   |
|             | LATED | 1,00             | 100 (90,8-100)     | 100 (92,3-100)     | 100 (95,6-100)     | 100   |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** AUC (área abaixo da curva); Esp (especificidade); Exa (exatidão); J (índice de Younden); OPER (operador); Sen (sensibilidade).

**Tabela 37** - Índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre laboratórios

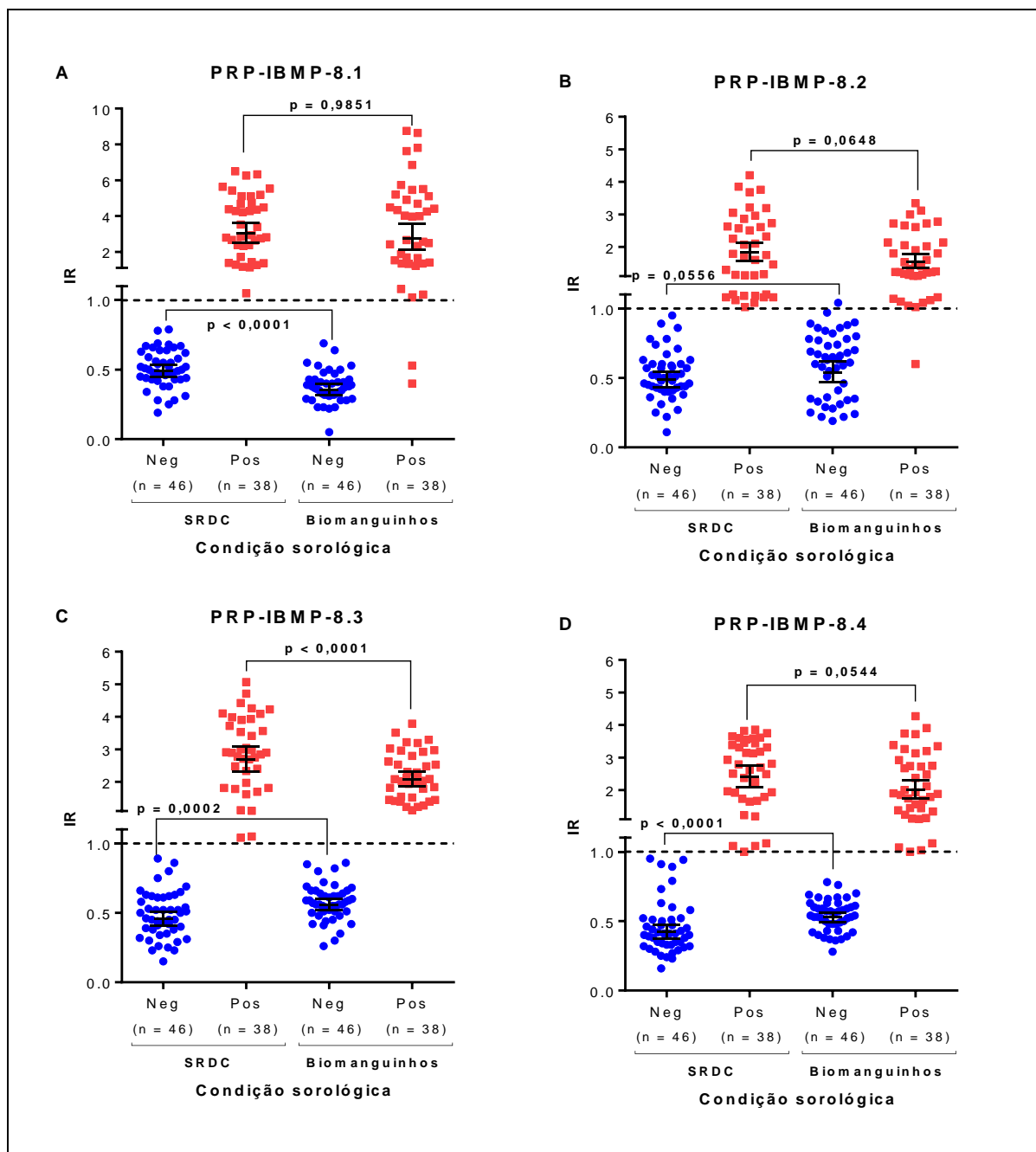
| PRP<br>IBMP | Operadores | AMOSTRAS POSITIVAS |           |          |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |          |      |
|-------------|------------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
|             |            | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   |
| 8.1         | SRDC       | 3,02               | 2,51-3,63 | 1,75     | 0,58 | 0,49               | 0,45-0,53 | 1,35     | 2,76 |
|             | LATED      | 2,76               | 2,13-3,57 | 2,19     | 0,80 | 0,36               | 0,32-0,40 | 1,48     | 4,17 |
| 8.2         | SRDC       | 1,83               | 1,56-2,13 | 1,61     | 0,88 | 0,49               | 0,43-0,54 | 1,47     | 3,02 |
|             | LATED      | 1,54               | 1,35-1,77 | 1,51     | 0,98 | 0,54               | 0,47-0,62 | 1,59     | 2,94 |
| 8.3         | SRDC       | 2,68               | 2,33-3,10 | 1,54     | 0,57 | 0,46               | 0,41-0,51 | 1,46     | 3,20 |
|             | LATED      | 2,08               | 1,86-2,32 | 1,40     | 0,67 | 0,56               | 0,52-0,60 | 1,27     | 2,28 |
| 8.4         | SRDC       | 2,39               | 2,08-2,76 | 1,53     | 0,64 | 0,42               | 0,37-0,47 | 1,48     | 3,52 |
|             | LATED      | 2,00               | 1,73-2,31 | 1,56     | 0,78 | 0,53               | 0,49-0,56 | 1,25     | 2,36 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:**  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).



**Figura 39** - Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação da reprodutibilidade entre laboratórios



**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) PRP-IBMP-8.1; (B) PRP-IBMP-8.2; (C) PRP-IBMP-8.3 (D); PRP-IBMP-8.4. Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Wilcoxon. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas.

**Legenda:** IR (índice de reatividade).

A análise do índice Kappa de Cohen relatou concordância de 95% dos resultados entre o SRDC e o LATED para os PRP-IBMP-8.1 e 8.2 e concordância perfeita para os demais antígenos. A correlação de Spearman exibiu valores de 0,88 a 0,91 (Tabela 38).

**Tabela 38** - Concordância qualitativa e correlação de Spearman dos PRP-IBMP na avaliação de reprodutibilidade entre laboratórios

| PRP<br>IBMP | Kappa de Cohen |             |                | Correlação de Spearman |             |         |
|-------------|----------------|-------------|----------------|------------------------|-------------|---------|
|             | $\kappa$       | IC95%       | Concordância   | r                      | IC95%       | p       |
| 8.1         | 0,95           | (0,89-1,00) | Quase perfeita | 0,90                   | (0,85-0,93) | <0,0001 |
| 8.2         | 0,95           | (0,89-1,00) | Quase perfeita | 0,86                   | (0,79-0,91) | <0,0001 |
| 8.3         | 1,00           | -           | Perfeita       | 0,91                   | (0,87-0,94) | <0,0001 |
| 8.4         | 1,00           | -           | Perfeita       | 0,88                   | (0,81-0,92) | <0,0001 |

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** IC (intervalo de confiança);  $\kappa$  (índice de Kappa de Cohen); r (correlação de Spearman).

### 7.6.6 Concordância de desempenho com kits comerciais

Como demonstrado na Tabela 39, a avaliação do painel sorológico utilizando os kits comerciais Gold Elisa Chagas e o Pathozyme<sup>®</sup> Chagas mostrou sensibilidade de 98,9% e 98,4%, e especificidade de 99,7%, e 96,7%, respectivamente. Demais parâmetros de desempenho podem ser visualizados diretamente na mesma Tabela.

**Tabela 39** – Comparação dos parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP com kits comerciais

| Teste | Sen (%)<br>(IC95%)  | Esp (%)<br>(IC95%)  | Exa (%)<br>(IC95%)  | Erro (%)<br>(IC95%) | J<br>(%) | RV+                      | RV-                    |
|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------|--------------------------|------------------------|
| 8.1   | 98,7<br>(97,7-99,3) | 99,4<br>(98,5-99,8) | 99,0<br>(98,4-99,4) | 1,0<br>(0,6-1,6)    | 98,1     | 167,8<br>(63,1-445,8)    | 0,025<br>(0,016-0,038) |
| 8.2   | 94,3<br>(92,5-95,6) | 99,6<br>(98,7-99,9) | 96,6<br>(95,6-97,4) | 3,4<br>(2,6-4,4)    | 93,8     | 216,2<br>(69,9-688,7)    | 0,058<br>(0,044-0,076) |
| 8.3   | 97,9<br>(96,7-98,7) | 99,9<br>(99,2-100)  | 98,8<br>(98,1-99,2) | 1,2<br>(0,8-1,9)    | 97,7     | 673,5<br>(95,0-4774,7)   | 0,021<br>(0,013-0,033) |
| 8.4   | 99,3<br>(98,5-99,7) | 100<br>(99,4-100)   | 99,6<br>(99,2-99,8) | 0,4<br>(0,2-0,8)    | 99,3     | 1985,0<br>(70,3-56064,3) | 0,007<br>(0,003-0,016) |
| Gold  | 98,9<br>(98,0-99,4) | 99,7<br>(98,9-99,9) | 99,3<br>(98,7-99,6) | 0,7<br>(0,4-1,3)    | 98,7     | 340,4<br>(85,3-1358,3)   | 0,011<br>(0,006-0,020) |
| Patho | 98,4<br>(97,3-99,0) | 96,7<br>(95,0-97,8) | 97,6<br>(96,7-98,3) | 2,4<br>(1,7-3,3)    | 95,0     | 29,42<br>(19,7-44,0)     | 0,017<br>(0,010-0,029) |

**Fonte:** O autor.

**Nota:** Kits comerciais: Gold Elisa Chagas (REM, Brasil) e Pathozyme<sup>®</sup> Chagas (Omega, Reino Unido).

**Legenda:** Esp (especificidade); Exa (exatidão); Gold (Gold Elisa Chagas); IC (intervalo de confiança); J (índice de Youden); Patho (Pathozyme<sup>®</sup> Chagas); Sen (sensibilidade).

Os valores médios dos IR relativos ao Gold Elisa Chagas e ao Pathozyme<sup>®</sup> Chagas para as amostras positivas e negativas são exibidos na Tabela 40. As análises gráficas e a avaliação da significância estatística entre os grupos podem ser visualizadas na Figura 40.

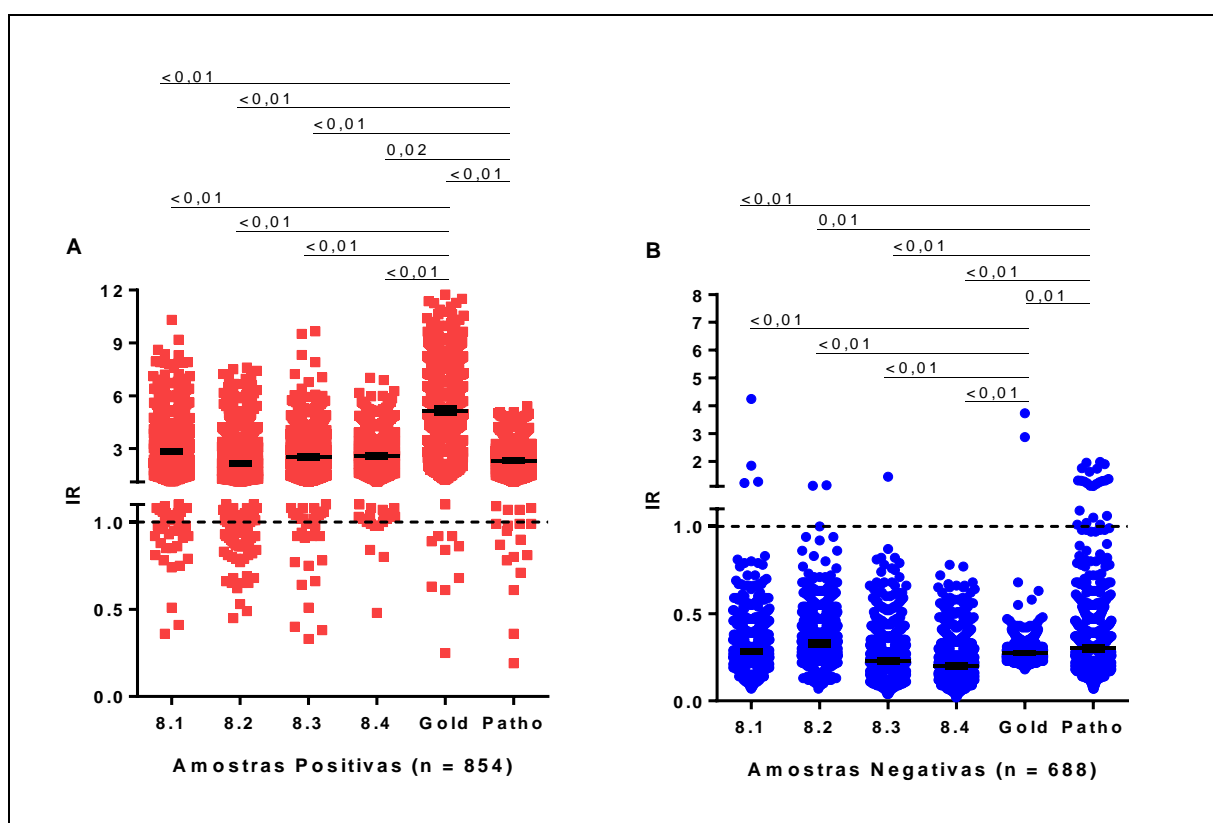
**Tabela 40** – Comparação dos índices de reatividade dos PRP-IBMP com kits comerciais

| Condições de análise | AMOSTRAS POSITIVAS |           |          |      | AMOSTRAS NEGATIVAS |           |          |      |
|----------------------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
|                      | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                 | IC95%     | $\sigma$ | CV   |
| PRP-IBMP-8.1         | 2,85               | 2,75-2,95 | 1,68     | 0,59 | 0,28               | 0,27-0,29 | 1,59     | 5,66 |
| PRP-IBMP-8.2         | 2,15               | 2,07-2,22 | 1,68     | 0,78 | 0,33               | 0,32-0,34 | 1,50     | 4,55 |
| PRP-IBMP-8.3         | 2,54               | 2,47-2,62 | 1,56     | 0,61 | 0,23               | 0,22-0,24 | 1,73     | 7,49 |
| PRP-IBMP-8.4         | 2,58               | 2,52-2,65 | 1,45     | 0,56 | 0,20               | 0,19-0,21 | 1,77     | 8,92 |
| Gold Elisa Chagas    | 5,15               | 4,97-5,33 | 1,67     | 0,32 | 0,27               | 0,26-0,28 | 1,24     | 4,51 |
| Pathozyme® Chagas    | 2,30               | 2,24-2,35 | 1,43     | 0,62 | 0,30               | 0,29-0,31 | 1,74     | 5,76 |

**Fonte:** O autor.

**Nota:** Kits comerciais: Gold Elisa Chagas (REM, Brasil) e Pathozyme® Chagas (Omega, Reino Unido).

**Legenda:**  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

**Figura 40** - Comparação dos índices de reatividade entre os PRP-IBMP e kits comerciais

**Fonte:** O autor.

**Nota:** Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Wilcoxon. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas.

**Legenda:** Gold (Gold Elisa Chagas); IR (índice de reatividade); Patho (Pathozyme® Chagas).

A análise da correlação de Spearman entre os resultados obtidos pelos kits comerciais com aqueles obtidos pelos PRP-IBMP mostrou valores acima de 0,80 para todas as possibilidades de análise (Tabela 41). Entre os kits a correlação determinada foi de 0,82 (IC95%: 0,80-0,84).

**Tabela 41** - Análise da correlação entre os PRP-IBMP com kits comerciais

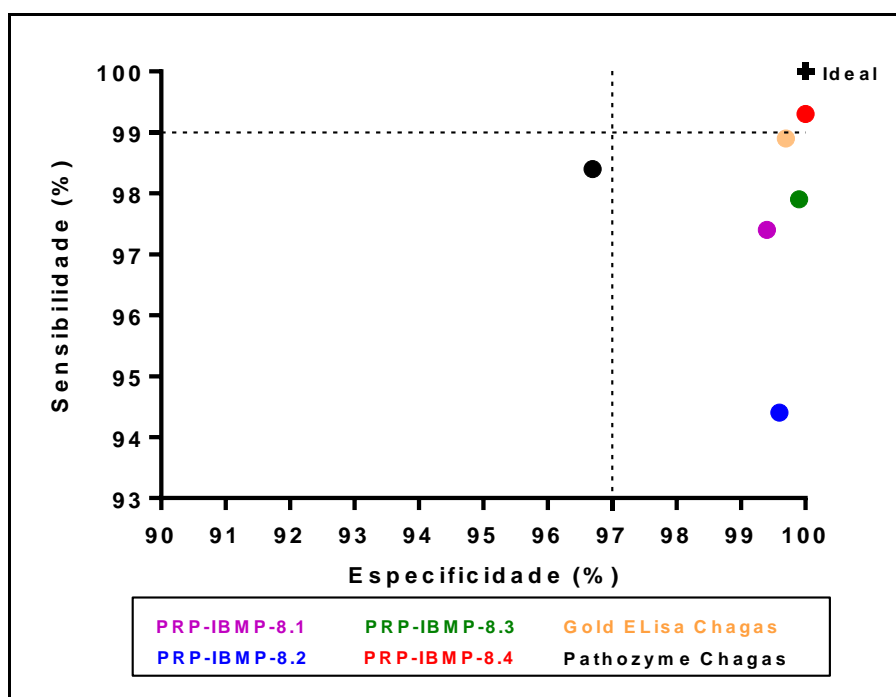
| PRP<br>IBMP | Gold Elisa Chagas |             | Pathozyme <sup>®</sup> Chagas |             |
|-------------|-------------------|-------------|-------------------------------|-------------|
|             | r                 | IC95%       | r                             | IC95%       |
| 8.1         | 0,81              | (0,79-0,82) | 0,80                          | (0,78-0,81) |
| 8.2         | 0,83              | (0,81-0,84) | 0,81                          | (0,80-0,83) |
| 8.3         | 0,86              | (0,84-0,87) | 0,84                          | (0,82-0,85) |
| 8.4         | 0,84              | (0,83-0,86) | 0,84                          | (0,82-0,85) |

**Fonte:** O autor.

**Nota:** Kits comerciais: Gold Elisa Chagas (REM, Brasil) e Pathozyme<sup>®</sup> Chagas (Omega, Reino Unido).

**Legenda** IC (intervalo de confiança); r (correlação de Spearman).

A Figura 41 apresenta um gráfico de sensibilidade versus especificidade no qual podem ser visualizados os parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP e dos kits comerciais Gold Elisa Chagas e Pathozyme<sup>®</sup> Chagas.

**Figura 41** - Classificação dos PRP-IBMP e kits comerciais para Chagas quanto aos parâmetros de desempenho

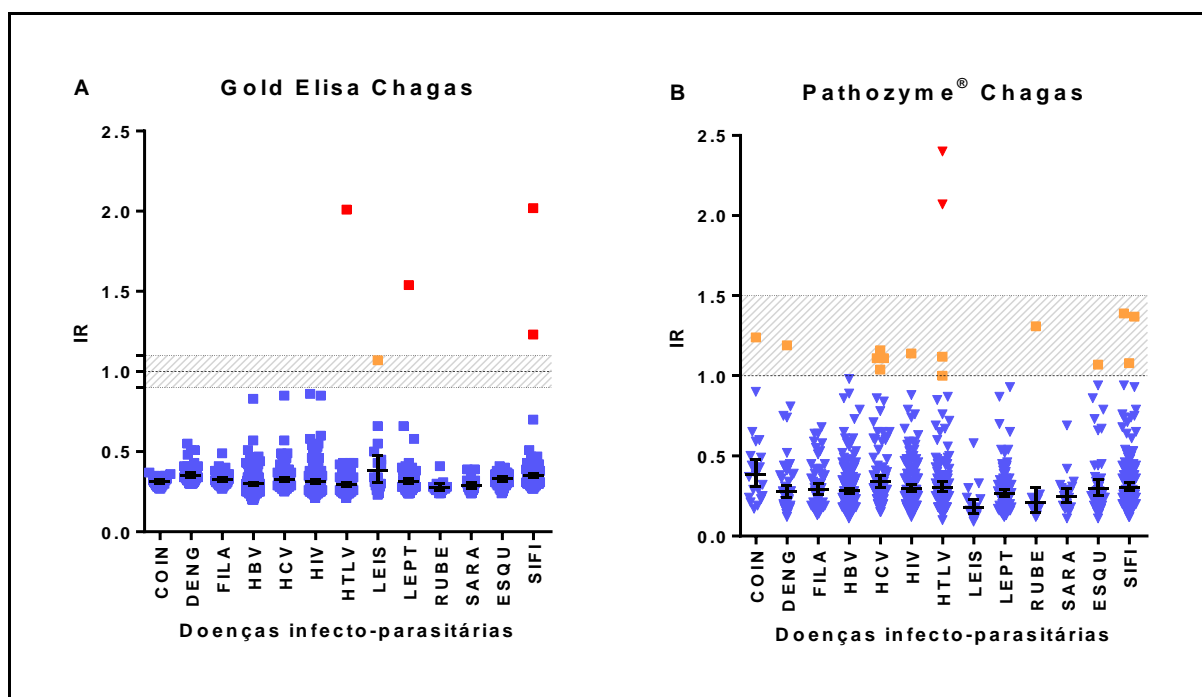
**Fonte:** O autor.

**Nota:** O símbolo “+” representa um teste ideal com sensibilidade e especificidade de 100%.

Das 932 amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias 0,43% (4/932) apresentou reatividade para a doença de Chagas (sífilis: 2; HTLV:

1; leptospirose: 1) no kit Gold Elisa Chagas (Figura 42A). Para o Pathozyme<sup>®</sup> Chagas 0,21% (2/932) das amostras foi reativa para Chagas (HTLV: 2). No entanto, o Gold Elisa Chagas forneceu somente 0,12% (1/932) de resultado inconclusivo (leishmaniose: 1), enquanto que o Pathozyme<sup>®</sup> Chagas forneceu 1,50% (14/932) de resultado nesta condição (co-infecção HIV/HBV: 1; dengue: 1; HCV: 4; HIV: 1; HTLV: 3; rubéola:1; esquistossomose: 1; sífilis: 3) (Figura 42B). Os valores dos IR médios para ambos os kits estão descritos na Tabela 42.

**Figura 42** – Análise gráfica dos índices de reatividade dos testes comerciais com amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias



**Fonte:** O autor.

**Nota:** (A) Gold Elisa Chagas; (B) Pathozyme<sup>®</sup> Chagas (B). Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ( $CO \pm 10\%$ ). Reatividade cruzada é representada pela coloração em vermelho e resultados inconclusivos pela coloração laranja. Co-infecções conforme descritas na Tabela 20.

**Legenda:** COIN (co-infecção); DENG (dengue); ESQU (esquistossomose); FILA (filariose); HBV (vírus da hepatite B); HCV (vírus da hepatite C), HIV (vírus da imunodeficiência humana), HTLV (vírus linfotrófico de células T humanas); IR (índice de reatividade); LEIS (leishmaniose); LEPT (leptospirose); RUBE (rubéola); SARA (sarampo); SIFI (sífilis).

**Tabela 42** - Índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias

| Morbidades      | Gold Elisa Chagas |           |          |      | Pathozyme® Chagas |           |          |      |
|-----------------|-------------------|-----------|----------|------|-------------------|-----------|----------|------|
|                 | IR                | IC95%     | $\sigma$ | CV   | IR                | IC95%     | $\sigma$ | CV   |
| Co-infecções    | 0,31              | 0,30-0,33 | 1,10     | 3,35 | 0,38              | 0,31-0,48 | 1,66     | 4,32 |
| Dengue          | 0,35              | 0,34-0,37 | 1,116    | 3,27 | 0,27              | 0,24-0,32 | 1,65     | 6,03 |
| Esquistossomose | 0,33              | 0,32-0,34 | 1,14     | 3,44 | 0,30              | 0,25-0,35 | 1,73     | 5,78 |
| Filariose       | 0,33              | 0,32-0,34 | 1,12     | 3,44 | 0,29              | 0,26-0,33 | 1,54     | 5,25 |
| HBV             | 0,30              | 0,29-0,31 | 1,22     | 4,08 | 0,28              | 0,26-0,30 | 1,53     | 5,44 |
| HCV             | 0,33              | 0,31-0,34 | 1,21     | 3,70 | 0,34              | 0,31-0,38 | 1,62     | 4,74 |
| HIV             | 0,31              | 0,30-0,33 | 1,29     | 4,11 | 0,30              | 0,28-0,32 | 1,52     | 5,09 |
| HTLV            | 0,29              | 0,28-0,31 | 1,27     | 4,33 | 0,31              | 0,28-0,34 | 1,71     | 5,62 |
| Leishmaniose    | 0,38              | 0,31-0,47 | 1,51     | 3,94 | 0,18              | 0,14-0,23 | 1,60     | 8,96 |
| Leptospirose    | 0,32              | 0,30-0,33 | 1,26     | 4,00 | 0,27              | 0,25-0,29 | 1,52     | 5,68 |
| Rubéola         | 0,28              | 0,26-0,30 | 1,15     | 4,14 | 0,21              | 0,15-0,30 | 1,81     | 8,54 |
| Sarampo         | 0,29              | 0,27-0,30 | 1,15     | 4,03 | 0,25              | 0,21-0,30 | 1,49     | 6,01 |
| Sífilis         | 0,35              | 0,34-0,36 | 1,26     | 3,60 | 0,31              | 0,28-0,33 | 1,64     | 5,36 |

**Fonte:** O autor.

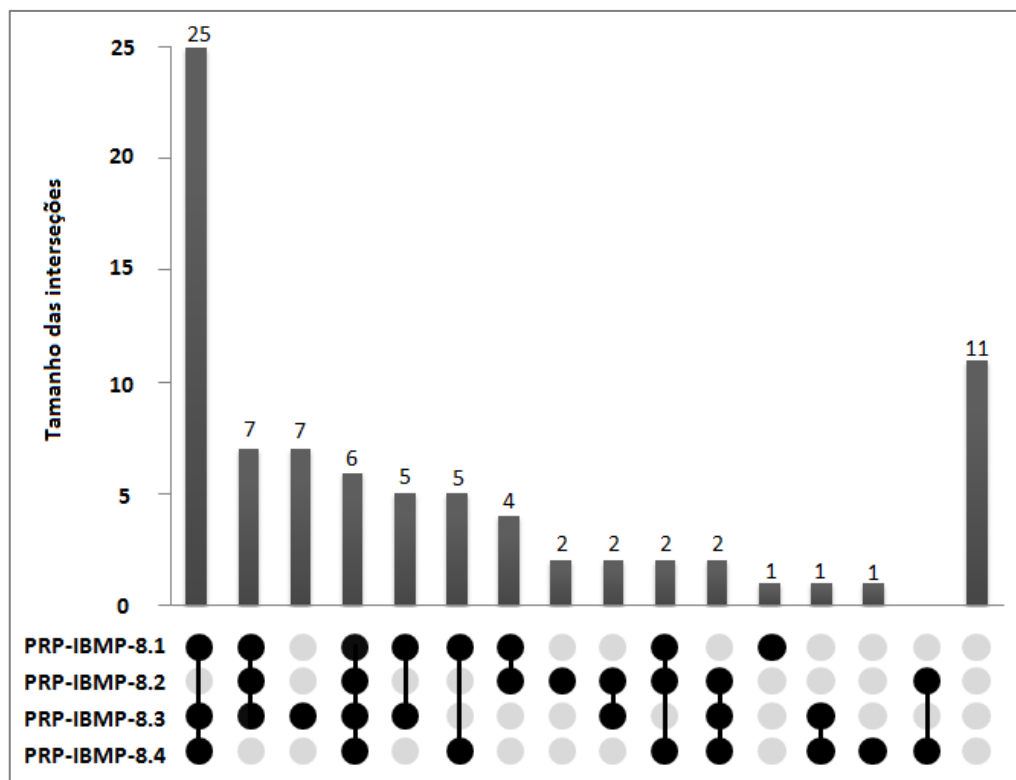
**Nota:** Co-infecções conforme descritas na Tabela 20.

**Legenda:**  $\sigma$  (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); HBV (vírus da hepatite B); HCV (vírus da hepatite C), HIV (vírus da imunodeficiência humana), HTLV (vírus linfotrópico de células T humanas); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

#### 7.6.7 Análise dos resultados inconclusivos

Do total de amostras séricas positivas para a doença de Chagas cedidas pelas Instituições parceiras, 81 (8,6%) (Tabela 20) apresentaram resultados discordantes quando submetidas à análise dos testes usados como padrão-ouro neste estudo. As análises utilizando os PRP-IBMP isoladamente ou em diferentes combinações (interseções de conjuntos) encontram-se descritas na Figura 43.

**Figura 43** - Análise gráfica da avaliação das interseções de conjuntos usando os PRP-IBMP usando amostras com resultados inconclusivos



Fonte: O autor.

---

## 8 DISCUSSÃO

A ausência de metodologia de referência consensual para o diagnóstico sorológico dos casos crônicos tem contribuído negativamente na doença de Chagas (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). A principal problemática refere-se, principalmente, à escolha da matriz antigênica empregada na detecção de anticorpos específicos e à variabilidade antigênica observada no *T. cruzi* (DUARTE et al., 2014). Na tentativa de minimizar estes problemas, quatro proteínas quiméricas, formadas por repetições imunodominantes de antígenos de diferentes regiões do parasita, foram sintetizadas por técnicas de engenharia genética. Tais proteínas foram caracterizadas e os seus parâmetros de desempenho avaliados para o diagnóstico sorológico da doença, utilizando amostras provenientes de indivíduos soronegativos e soropositivos, procedentes de diversas regiões geográficas do Brasil, e também amostras positivas para outras patologias com objetivo de verificar a ocorrência de reações cruzadas. Os resultados destas avaliações são discutidos a seguir.

### 8.1 Avaliação do perfil proteico

Após a purificação dos antígenos IBMP, a concentração foi determinada por fluorimetria, representando uma vantagem frente aos métodos colorimétricos usuais, os quais apresentam limitações para proteínas que possuem resíduos de tirosina e triptófano em suas constituições, além de serem sujeitos à interferência causada por inúmeros compostos (MANCHESTER, 1996). A integridade dos PRP-IBMP, verificada através de SDS-PAGE, revelou a presença de banda única para os antígenos IBMP-8.1, 8.2 e 8.3. Para o PRP-IBMP-8.4 foi observada a presença de uma banda indicativa da proteína (45 kDa) e uma outra de baixa intensidade com peso molecular aproximado de 40 kDa, indicando degradação da quimera nas etapas precedentes de expressão, purificação ou armazenamento. No entanto, esta degradação não interferiu nos imunoenaios realizados neste estudo, pois a molécula IBMP-8.4, e as demais, são constituídas por regiões imunodominantes das proteínas nativas do *T. cruzi* contendo poucos resíduos de aminoácidos de extensão. Estas observações aliadas aos resultados obtidos nos ensaios de dicroísmo circular, os quais indicam que as moléculas são ricas em estruturas em *coil*, corroboram com a ideia de que sejam constituídas por epítomos lineares, e não conformacionais. Sendo assim, para uma degradação interferir na capacidade de interação antígeno-anticorpo a sua intensidade deve ser suficientemente grande a ponto de



---

gerar fragmentos menores que oito resíduos de aminoácidos, tamanho necessário para que a interação aconteça (GREENBAUM et al., 2007; PELLEQUER; WESTHOF; VAN REGENMORTEL, 1991).

## 8.2 Definição do padrão-ouro

Estudos de validação de novas metodologias ou de matrizes antigênicas têm como finalidade investigar os parâmetros de desempenho do teste de interesse ao ser confrontado com um teste de referência (ou padrão-ouro), sendo este último considerado o melhor método disponível para estabelecer a presença ou ausência de um agravo. Em virtude da inexistência de um teste de referência para a doença de Chagas e seguindo as recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005), foi realizada uma avaliação prévia de testes de ELISA, disponíveis no Brasil, para a seleção daqueles que apresentassem os melhores parâmetros de desempenho com a finalidade de compor o padrão-ouro a ser adotado neste estudo. Para esta avaliação foram utilizados os kits comerciais descritos na Nota Técnica N°03/06 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), que possuíam registro ativo na ANVISA em dezembro de 2013 e que apresentaram sensibilidade e especificidade diagnósticas iguais ou superiores a 99% e 97%, respectivamente, conforme recomendação da própria Nota Técnica. Desta forma, somente o Elisa Chagas III (BiosChile, Grupo Bios, Santiago, Chile), Imuno-Elisa Wama (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brasil), o Pathozyme® Chagas (Omega Diagnostics, Escócia, Reino Unido) e o Gold Elisa Chagas (Rem, São Paulo, Brasil) preencheram os critérios acima, sendo, portanto, selecionados para o estudo. Apesar dos quatro testes utilizarem os mesmos princípios metodológicos as matrizes antigênicas são distintas: o Elisa Chagas III utiliza extratos totais das cepas Mn e Tulahuen; o Imuno-Elisa Chagas e o Pathozyme® Chagas utilizam antígenos recombinantes; e o Gold Elisa Chagas utiliza antígenos recombinantes acrescidos de lisado purificado obtido de epimastigotas de cepas brasileiras. Como já esperado para um kit comercial foi verificado que os IR foram significativamente mais elevados no grupo de amostras positivas para a doença de Chagas quando comparado ao grupo de amostras negativas, sugerindo boa habilidade discriminatória. O IR das amostras positivas obtido usando o Gold Elisa Chagas mostrou-se superior (2x) do que aquele obtido com os demais kits, sendo esta diferença estatisticamente significativa em virtude da ausência de sobreposição dos intervalos de confiança a 95%. Em relação às amostras negativas, o menor IR alcançado foi aquele obtido com o uso do Imuno-Elisa Chagas, sendo

significativamente menor do que aquele observado para os outros kits avaliados. De acordo com (DUARTE et al., 2014), as diferenças de reatividade encontradas ocorrem devido a diferentes composições e misturas de antígenos do *T. cruzi*. No entanto, informações sobre a composição exata dos antígenos recombinantes ou das frações antigênicas empregadas em cada kit não puderam ser obtidas devido à ausência destas informações nas bulas fornecidas pelos fabricantes.

Quanto aos parâmetros de desempenho, foram observados valores de sensibilidade e especificidade de 97,3-100% e 97,0-100%, respectivamente. A avaliação da sensibilidade indicou não haver diferença significativa do desempenho dos quatro kits em detectar anticorpos anti-*T. cruzi* no grupo de amostras positivas, pois os intervalos de confiança mostraram-se sobrepostos. Quanto à especificidade, foi verificado que o Pathozyme<sup>®</sup> Chagas apresentou desempenho inferior quando comparado ao Elisa Chagas III e ao Gold Elisa Chagas. Além disso, este mesmo kit foi o que apresentou um desempenho insatisfatório quanto à sua capacidade em fornecer resultados corretos, como pode ser verificado através da análise dos intervalos de confiança determinados para a exatidão, tornando o seu uso inviável como um dos testes de referência no presente estudo. Desta maneira, a seleção final dos kits para esta finalidade foi baseada nas recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005) e na composição antigênica empregada por cada um deles. Assim, foi excluído o Gold Elisa Chagas pela possibilidade de compartilhamento de matriz antigênica com o Elisa Chagas III e com o Imuno-Elisa Wama, sendo estes últimos os testes selecionados para definição do estado sorológico da infecção causada pelo *T. cruzi* em todas as amostras usadas neste estudo.

### **8.3 Avaliação do sistema-tampão para sensibilização das microplacas**

O estudo do potencial diagnóstico dos PRP-IBMP, como marcadores laboratoriais para o diagnóstico da infecção de Chagas na fase crônica, foi iniciado com a padronização dos componentes do ELISA. Inicialmente, três sistemas-tampão, com diferentes características de pH e força iônica, foram avaliados visando obter informações sobre o conteúdo da estrutura secundária e estado de oligomerização dos PRP-IBMP. Esta foi uma etapa importante, visto que quanto menos oligomerizados estiverem os antígenos mais disponíveis estarão os epítomos para a interação antígeno-anticorpo durante a realização dos imunoenaios. Além do mais, pretendeu-se trabalhar com moléculas com o menor conteúdo de estruturas secundárias, para evitar o surgimento de neo-epítomos diminuindo, portanto, a possibilidade de reações

---

indesejadas. Resultados da metodologia de espalhamento dinâmico da luz (EDL) revelaram menor polidispersividade das moléculas quando diluídas em carbonato de sódio (50 mM, pH 9,6), evidenciando baixa tendência de agregação neste sistema tampão. A polidispersividade é uma medida que avalia a distribuição do tamanho das moléculas em suspensão, oferecendo informações sobre a homogeneidade das partículas. Assim, quanto menor o seu valor, mais monodispersa e, conseqüentemente, menos heterogênea é a amostra. Para os PRP-IBMP-8.1, 8.2 e 8.4 foi observado, respectivamente, que 94%, 99,8% e 99,5% da massa proteica em suspensão no carbonato de sódio (50 mM, pH 9,6) apresentaram o dobro de peso molecular ao serem comparadas com os resultados obtidos no SDS-PAGE, sugerindo que estas moléculas tenham adquirido estado conformacional de maior estabilidade em sua forma dimérica. Por outro lado, o PRP-IBMP-8.3 apresentou 97,9% de sua massa com peso molecular de 88 kDa, sendo consistente com a conformação trimérica, visto que seu peso molecular no SDS-PAGE é de 30 kDa. Outra maneira de avaliar as conformações de maior estabilidade é através da comparação do raio hidrodinâmico, obtido no ensaio de EDL, com o raio de giro, obtido através de programas computacionais que realizam a predição da estrutura tridimensional de moléculas com base em modelos tridimensionais depositados em bancos de dados na internet (OLIVEIRA, 2014). Entretanto, dada a ausência de similaridade entre as proteínas quiméricas IBMP com os modelos depositados nos bancos de dados a estimativa do raio de giro não pôde ser realizada.

Os espectros de dicroísmo circular (DC) gerados para os PRP-IBMP-8.1 e 8.3 mostraram perfil típico de proteína sem estrutura secundária nos três sistemas-tampão. A sobreposição dos espectros para o antígeno IBMP-8.1 demonstra não haver influência do pH na conformação proteica, ao passo que mudanças no pH afetam levemente o sinal de DC na região *coil* (202-206 nm) para o PRP-IBMP-8.3, havendo maior absorção do sinal em pH mais ácido. Para os PRP-IBMP-8.2 e 8.4 os espectros demonstram perfil proteico com conteúdo relativamente alto de  $\alpha$ -hélices (com sinal negativo na região de 208 e 220 nm), mas com grande quantidade de estruturas em *coil*. Em pH mais baixo, como no caso do sistema MES (50 mM, pH 5,5), foi observado para ambas as moléculas um pequeno aumento na quantidade de estruturas secundárias, o que se torna menos evidente quando presentes no carbonato de sódio (50 mM, pH 9,6). Resultados diferentes foram encontrados por Duranti et al. (1999) para uma proteína recombinante não quimérica denominada B13 que, além de apresentar em sua constituição sequências repetitivas de aminoácidos, é rica em estruturas em  $\alpha$ -hélices, sugerindo ser a região de reconhecimento dos anticorpos, possuindo, desta maneira,

---

epítomos conformacionais. Com base nos resultados obtidos pelo EDL, ficou evidente que o sistema tampão carbonato de sódio (50 mM, pH 9,6), por levar a um menor estado de oligomerização dos antígenos, foi o mais indicado para sensibilização das placas, apesar das moléculas não estarem na forma monomérica. Quanto aos dados fornecidos pelo DC, dada a ausência ou escassez de estrutura secundária caracterizada para as quatro moléculas, os sistemas tampão carbonato de sódio (50 mM, pH 9,6) e o fosfato de sódio (50 mM, pH 7,5) foram os mais indicados para a sensibilização das microplacas, pois os PRP-IBMP-8.2 e 8.4 sofrem influência de pH ácido, descartando a utilização do MES (50 mM, pH 5,5). Desta forma, a análise conjunta de ambas as metodologias evidencia que o tampão carbonato de sódio (50 mM, pH 9,6) constituiu o sistema de escolha para sensibilização das microplacas.

#### **8.4 Padronização e otimização dos componentes do ELISA**

A utilização de amostras séricas e anticorpo secundário nas diluições de 1:100 e 1:40.000, respectivamente, preencheram os critérios de aceitação pré-estabelecidos para padronização dos componentes do ELISA. Estes resultados aliados às quantidades de 12,5 ng do PRP-IBMP-8.2 e 25 ng dos PRP-IBMP-8.1, 8.3 e 8.4 por cavidade foram as que melhor discriminaram amostras positivas de negativas. Na tentativa de ampliar a capacidade discriminatória usando os PRP-IBMP nas condições selecionadas acima, foram avaliados os efeitos da adição do SFB e do BSA como agentes bloqueadores ao tampão de diluição de amostras. Para o PRP-IBMP-8.1, a adição do SFB 2,5% foi capaz de elevar significativamente o IR das amostras positivas quando comparado aos demais grupos e de reduzi-lo significativamente no grupo de amostras negativas, exceto quando comparado ao ensaio realizado sem adição de agentes bloqueadores. Para as demais moléculas, a utilização de agentes bloqueadores mostrou-se indiferente ou menos eficaz na capacidade de discriminar amostras positivas de negativas quando comparada ao ensaio realizado na ausência destas substâncias. A análise dos parâmetros de desempenho não revelou diferença significativa para nenhuma das moléculas nas diferentes condições testadas, visto que os intervalos de confiança a 95% da sensibilidade, especificidade e acurácia se sobrepõem. Assim, a adição de SFB 2,5% nos ensaios com o PRP-IBMP-8.1 apresentou vantagens quando comparada às demais variáveis testadas por ser capaz de promover maior diferenciação entre amostras positivas e negativas, apesar de não haver diferenças quando os parâmetros de desempenho foram calculados. Para os antígenos IBMP-8.2, 8.3 e 8.4 a adição dos agentes bloqueadores não

demonstrou benefícios significativos, e a sua ausência representou simplicidade diagnóstica e redução de custos.

### **8.5 Avaliação da estabilidade estrutural e funcional dos PRP-IBMP**

Diversos ensaios foram delineados com o objetivo de avaliar a estabilidade da estrutura secundária e a capacidade funcional dos PRP-IBMP em detectar anticorpos anti-*T. cruzi*, após serem submetidos a diferentes condições de temperatura e tempo de estocagem. Nos ensaios iniciais, referentes à estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas, foi verificado que os espectros de DC, gerados para os antígenos IBMP-8.1, 8.2 e 8.4 apresentaram comportamentos similares durante as etapas de desnaturação e renaturação, demonstrando possuir alta capacidade de renaturação. A determinação da quantidade de proteína renaturada foi estabelecida com base na diferença percentual do sinal de DC (em miligraus) gerado no início e ao final do ensaio no comprimento de onda de 202 nm. Desta maneira, uma renaturação de 100% indica, por exemplo, que ambos os sinais são coincidentes. Para o PRP-IBMP-8.3 os espectros de DC demonstraram não haver sobreposição dos sinais, sugerindo baixa capacidade deste antígeno em retornar à sua conformação inicial. Para comprovar estes resultados, os experimentos foram repetidos e os achados confirmados, indicando que 90,8% da proteína manteve-se precipitada mesmo após serem restabelecidas as condições iniciais. Através do SDS-PAGE foi visualizado que os antígenos IBMP-8.1 e 8.2 sofreram degradação após o ensaio, principalmente quando o equipamento encontrava-se programado para permanecer 10 e 20 minutos em cada patamar de temperatura. No caso do PRP-IBMP-8.1, esta degradação ocasionou redução significativa do IR das amostras positivas quando a proteína foi estressada por 10 e 20 minutos, levando também a uma redução na sensibilidade do teste (porém não significativa). O PRP-IBMP-8.2, apesar da degradação visualizada no gel, continuou a ser reconhecido pelos anticorpos presentes nas amostras dos indivíduos soropositivos para a doença de Chagas, não havendo redução significativa da sensibilidade do ensaio, mesmo em condições mais adversas (10 e 20 minutos). Já os antígenos IBMP-8.3 e 8.4 mostraram-se estáveis, apesar de pequena degradação visualizada em 10 e 20 minutos. Semelhantemente ao PRP-IBMP-8.2, não houve redução significativa do sinal e dos parâmetros de desempenho para estas moléculas. Estes dados indicam que o PRP-IBMP-8.3, permaneceu funcional quanto à sua capacidade de detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* mesmo tendo 90,8% da proteína na forma precipitada. A análise das amostras negativas indicou não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores de IR e de especificidade dos

---

PRP-IBMP submetidos ao estresse térmico frente aos antígenos em estado nativo, exceto para o PRP-IBMP-8.3 que apresentou redução significativa do IR, mas não da especificidade. A concordância dos resultados obtidos da análise das proteínas nativas e das proteínas estressadas a 1, 10 e 20 minutos mostrou-se perfeita ou quase perfeita. Os dados produzidos a partir destes ensaios indicam que o PRP-IBMP-8.4 acumula diversas vantagens, conferidas por sua alta capacidade em readquirir sua estrutura secundária nativa, sofrer pouca degradação e manter a eficiência em reconhecer anticorpos anti-*T. cruzi* em amostras séricas provenientes de indivíduos positivos para a doença de Chagas, mesmo após ser submetido a altas temperaturas. Diferentemente do antígeno IBMP-8.4, as demais moléculas não reuniram todas as vantagens descritas acima. A escassez de literatura científica pertinente a este tipo de avaliação limita as comparações com os resultados obtidos pelo nosso grupo. Os que existem limitam-se apenas em analisar a capacidade funcional de antígenos já impregnados em fase sólida, os quais demonstram diminuição da sensibilidade quando os testes são executados em temperaturas acima de 35°C (BLACKSELL et al., 2006; CHIODINI et al., 2007; PHOMMASONNE et al., 2015). Por outro lado, há diversos estudos nesta área que utilizam proteínas recombinantes para fins imunoterapêuticos ou imunoprolifáticos, sendo verificado que algumas delas perdem estabilidade funcional em temperaturas acima de 42°C e sofrem degradação acima de 72°C (RANI; GOGOI; KUMAR, 2014; RANI; KUMAR, 2015). A estabilidade estrutural e funcional dos PRP-IBMP frente a estes estudos pode ser decorrente do pequeno tamanho que eles possuem (17 a 45 kDa), inexistência de epítomos conformacionais e presença marcante de estruturas em *coil*.

Em seguida, alguns ensaios foram conduzidos com a finalidade de avaliar a estabilidade da estrutura secundária e funcionalidade dos PRP-IBMP ao permanecerem em temperatura ambiente (25°C), no sistema carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6), por um período de até 120 horas. Espectros de DC apontaram que o PRP-IBMP-8.1 foi o antígeno que apresentou maior estabilidade ao final de 96 horas, havendo somente 18,6% de precipitação da massa proteica neste período. No entanto, foi visualizada degradação gradual da molécula a partir de 24 horas, sendo total após 96 horas de incubação, o que ocasionou redução significativa dos valores dos IR e dos parâmetros de desempenho (sensibilidade, exatidão e índice J) a partir de 48 horas de incubação. A molécula IBMP-8.2, mesmo apresentando precipitação de 100% após 96 horas de incubação e degradação evidente a partir de 48 horas, não exibiu redução dos valores de IR e dos parâmetros de desempenho, indicando ser funcionalmente estável por até 120 horas de incubação. O PRP-IBMP-8.3 sofreu degradação gradual após 24 horas de

---

incubação, sendo detectada precipitação de 41,7% de sua massa após 96 horas. Apesar destes achados, a funcionalidade da molécula em reconhecer anticorpos anti-*T. cruzi* em amostras séricas positivas para a doença de Chagas permaneceu inalterada, conforme verificado pela análise dos valores de IR e pelos parâmetros de desempenho. Por outro lado, o PRP-IBMP-8.4 mostrou-se bastante sensível, sendo observada precipitação de 54,5% de sua massa proteica, degradação considerável a partir de 72 horas, e redução significativa dos valores de IR das amostras positivas e dos parâmetros de desempenho já a partir de 24 horas de incubação. Estes dados indicam que, contrariamente aos PRP-IBMP-8.2 e 8.3, os antígenos IBMP-8.1 e 8.4 são estruturalmente e funcionalmente instáveis em temperatura ambiente por períodos superiores a 48 e 24 horas, respectivamente, devendo ser armazenados, quando em solução, em temperaturas de -20 a 4°C.

Por fim, a capacidade funcional dos PRP-IBMP, imobilizados em fase sólida, foi avaliada por um período de doze meses, totalizando oito pontos de análise. Os ensaios foram delineados de modo que, em cada um dos pontos, uma alíquota das amostras séricas fosse descongelada, avaliada e descartada, evitando, desta forma, distorções dos resultados em virtude de sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento (WHITING et al., 2004). Os valores de IR, determinados para o PRP-IBMP-8.1, exibiram resultados decrescentes à medida que os ensaios foram conduzidos, a ponto de se tornarem significativamente menores nos dois últimos períodos. Resultados semelhantes foram observados quando os parâmetros de sensibilidade e exatidão foram calculados, indicando que esta molécula perde reatividade contra anticorpos anti-*T. cruzi* ao longo do tempo, mesmo tendo sido utilizado o *WellChampion*<sup>TM</sup> (Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) como agente sensibilizante, o qual, além desta atividade, apresenta ação bloqueadora e estabiliza os antígenos, mantendo a sua atividade biológica e prevenindo degradação, desnaturação e lixiviação durante as etapas de lavagem do imunoensaio. Para os demais antígenos, a análise dos intervalos de confiança a 95% indica que os valores de IR e os parâmetros de desempenho permaneceram inalterados ao longo dos meses, exceto para a sensibilidade e exatidão do PRP-IBMP-8.2, que apresentou decréscimo significativo nos últimos três pontos investigados. Estes resultados sugerem que os antígenos IBMP-8.3 e 8.4 podem ser estáveis por períodos superiores ao estudado, mantendo sua capacidade reativa.

---

## 8.6 Avaliação da reprodutibilidade

Antes de iniciar os estudos de fase I e II, característicos por requererem maior investimento de tempo e de recursos financeiros, foram realizados os ensaios de reprodutibilidade, os quais tiveram a finalidade de investigar a consistência dos resultados quando as reações se repetiram. Caso alguma molécula não apresentasse resultados satisfatórios a sua avaliação como potencial diagnóstico seria descontinuada. Foram conduzidos três tipos de análise: a reprodutibilidade intraplaca, também denominada repetitividade ou precisão, as reprodutibilidades entre lotes e entre laboratórios. A primeira delas consiste na habilidade do teste em produzir resultados consistentes quando as reações são realizadas na mesma microplaca e sob as mesmas condições. A análise dos quatro PRP-IBMP mostrou não haver diferenças estatisticamente significativas quando os valores de AUC, Sen, Esp, Exa, J e IR foram comparados em ambas as determinações, tanto para o grupo de amostras positivas quanto para as negativas. Segundo Jacobson (1998), o coeficiente de variação (CV) deve ser inferior a 20% para que a reprodutibilidade seja aceitável. Em nosso caso, encontramos valores inferiores a 1% para as amostras positivas e 7% para as negativas, indicando que os ensaios utilizando os PRP-IBMP possuem boa repetitividade. Resultados semelhantes foram encontrados por Ferreira et al. (2001) que, ao estudarem a proteína recombinante quimérica TcF, encontraram CV de 1,37% para as amostras positivas. Além dos mais, a avaliação qualitativa e quantitativa da concordância entre as duas determinações revelou concordância quase perfeita para os PRP-IBMP-8.1, 8.2 e 8.4 e perfeita para o PRP-IBMP-8.3 com valores de  $r$  superiores a 0,88 na correlação de Spearman, indicando de fato que os antígenos IBMP apresentaram boa precisão nas análises.

Resultados semelhantes foram encontrados na avaliação da reprodutibilidade interlotes, na qual os valores de AUC, Sen, Esp, Exa e J não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Diferenças significativas foram observadas somente quando os valores dos IR foram comparados em ambos os lotes. No entanto, os valores dos coeficientes de variação não ultrapassaram 0,65% para as amostras positivas e 9,02% para as negativas. A concordância das reações usando os diferentes lotes demonstrou ser perfeita para o PRP-IBMP-8.1 e quase perfeita para os demais antígenos com valores de  $r$  acima de 0,80 na correlação de Spearman.

Por fim, a reprodutibilidade entre laboratórios demonstrou não haver diferenças nos valores de AUC e dos parâmetros de desempenho. Os coeficientes de variação ficaram abaixo de 1,0% para as amostras positivas e 4,2% para as negativas. A concordância entre os



---

operadores revelou ser perfeita para os antígenos IBMP-8.3 e 8.4 e quase perfeita para os demais com valores de  $r$  acima de 0,86 na correlação de Spearman.

As três avaliações mostraram-se reprodutíveis, com coeficiente de variação inferior a 1,00% para as amostras positivas e 10% para as negativas. Segundo Jacobson (1998) quanto menor a concentração de um analito em uma amostra maior será a imprecisão do teste, ou seja, maior o CV em repetições. Daí a explicação de termos obtido para valores de CV maiores para as amostras negativas do que nas positivas. Com base no exposto, fica evidente que os antígenos IBMP fornecem resultados precisos e reprodutíveis quando analisados na mesma placa, por diferentes operadores ou quando dois lotes de antígenos são analisados utilizando as mesmas condições.

### 8.7 Estudo de Fase I

Conceitualmente, os testes diagnósticos possuem a finalidade de reduzir incertezas, refletindo a probabilidade de classificar corretamente um indivíduo como portador ou não de um agravo. Este fato tem vital importância na tomada de decisão para o clínico ou para mudança de uma hipótese clínica inicial tendo, portanto, impacto direto na Saúde Pública. Uma vez que os estudos de validação de novas metodologias são caros e trabalhosos, é imprescindível que seja realizada prova de conceito (estudo piloto ou de fase I) para verificação prévia se o novo teste possui a capacidade de classificar corretamente os indivíduos frente a um agravo levando em consideração os limites da metodologia escolhida. Assim, com este objetivo, foi realizado um ensaio piloto para avaliação preliminar do desempenho diagnóstico dos PRP-IBMP, utilizando 280 amostras séricas positivas e 20 negativas para a doença de Chagas, previamente diagnosticadas segundo normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005). As amostras positivas foram escolhidas de modo a contemplar o exigido para este tipo de avaliação, ou seja, provenientes de indivíduos residentes em diferentes áreas endêmicas e em diferentes fases da doença. De modo semelhante, as amostras negativas foram oriundas de indivíduos residentes em áreas endêmicas e não endêmicas para a doença de Chagas. Os valores de AUC encontrados para os PRP-IBMP variaram de 98,39% a 99,86%, não havendo diferença entre eles devido à sobreposição dos intervalos de confiança a 95%. Estes dados indicam que as quatro construções apresentam elevada capacidade discriminatória na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*. Garcia et al. (2014) ao analisarem um painel composto por 25 amostras positivas e 25

---

negativas para a doença de Chagas encontraram valores de 0,92 a 0,96 para os poliantígenos recombinantes CP1 e CP2. Nossos resultados são ainda mais relevantes quando comparados com os valores obtidos a partir da análise de proteínas recombinantes não quiméricas, como pode ser comprovado ao verificar os valores para o antígeno *Tc13* (AUC = 0,96) usando 40 amostras soropositivas e 34 soronegativas (SANTAMARÍA et al., 2013), RP1 (AUC=0,85) e RP5 (AUC=0,85) usando 25 amostras de cada grupo (GARCIA et al., 2014). Em relação à utilização de lisado total do *T. cruzi*, os valores obtidos para as moléculas IBMP revelaram quase o dobro de capacidade em discriminar soronegativos de soropositivos, como apontado por Garcia et al. (2014) ao encontrarem o valor de 0,54 usando 25 amostras soronegativas e 25 soropositivas. A escolha da utilização da curva ROC para definição do ponto de corte baseou-se na possibilidade da visualização gráfica da multidimensionalidade dos pontos para diferentes valores de sensibilidade e especificidade. A partir destas várias possibilidades, o ponto de corte selecionado foi aquele que forneceu concomitantemente a menor quantidade de resultados falso-positivos e falso-negativos. Desta maneira, a área soba curva ROC (AUC) é uma determinação que resume o desempenho de um teste, já que é estimada levando-se em consideração todas as sensibilidades e especificidades relativas a cada um dos valores de ponto de corte estipulados (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003).

Ainda no estudo de fase I foram observados valores de sensibilidade de 95,36 a 99,64%, com diferença estatisticamente significativa somente entre os antígenos IBMP-8.3 e 8.4, em virtude da ausência de sobreposição dos intervalos de confiança a 95%. Em relação à especificidade, os valores variaram de 90,00% a 100%, não havendo diferença significativa entre eles. Quanto às análises dos IR foi observado, para os quatro antígenos, diferenças estatisticamente significativas entre amostras positivas e negativas ( $p < 0,0001$ ). Dentre as amostras positivas o sinal foi significativamente mais expressivo para as amostras analisadas com os PRP-IBMP-8.1 e 8.4. Entre os PRP-IBMP-8.2 e 8.3 não houve diferença significativa. Para as amostras negativas o menor sinal encontrado foi para o PRP-IBMP-8.1, não havendo diferença com os antígenos IBMP-8.3 e 8.4. Por outro lado, o PRP-IBMP-8.2 apresentou o maior sinal para este grupo de amostras não diferindo, entretanto, daquele encontrado para os PRP-IBMP-8.3 e 8.4. 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 foram eleitas para continuar no estudo sendo, portanto, iniciado o estudo de fase II.

## 8.8 Estudo de fase II

A realização do estudo de fase II requer condições de análise controladas, com determinações mais precisas dos parâmetros de desempenho e utilização de amostras séricas representativas do agravo, independentemente da fase da doença ou origem dos participantes. A determinação do número amostral mínimo foi estimada pelo programa estatístico R em 380 amostras negativas e 380 positivas para a doença de Chagas para um teste com especificidade e sensibilidade de 99%. O nosso painel contabilizou 1636 amostras, sendo 698 provenientes de indivíduos negativos e 938 de positivos para a doença. Deste quantitativo, 90 amostras (81 positivas e 9 negativas) foram excluídas do estudo por não preencherem os critérios de inclusão propostos no subitem 6.5.4. Apesar desta perda, o número amostral manteve-se acima do estimado pelo R, mesmo considerando a margem de segurança de 10% como medida de precaução. De fato, o número amostral foi o maior do que muitos estudos da área em doença de Chagas (CAMUSSONE et al., 2009; GADELHA et al., 2003; HOUGHTON et al., 2000; IZQUIERDO et al., 2013; OTANI et al., 2009; PERALTA et al., 1994). Entretanto semelhante a outros, principalmente daqueles em que as amostras utilizadas foram oriundas de bancos de sangue (BERRIZBEITIA et al., 2006; CHIPPAUX et al., 2009; DUARTE et al., 2014; LANGHI et al., 2002; OELEMAN et al., 1999; PIRARD et al., 2005; UMEZAWA et al., 2003; VERANI et al., 2009).

Os valores da AUC obtidos para os quatro antígenos foram superiores a 99,77%, revelando poder discriminatório quase perfeito entre amostras positivas e negativas para a doença de Chagas. Estes dados estão de acordo com os obtidos na Fase I. O valor da sensibilidade para o PRP-IBMP-8.4 foi de 99,30%, sendo estatisticamente superior àqueles calculados para os antígenos IBMP-8.1 (97,43%) e IBMP-8.2 (94,28%), conforme análise dos valores de confiança a 95%. Não houve, entretanto, diferença significativa em relação ao antígeno IBMP-8.3 (97,90%). O menor valor de sensibilidade foi encontrado para o PRP-IBMP-8.2, sendo provavelmente devido a sua composição. É sabido que o *T. cruzi* apresenta grande variação antigênica possuindo, inclusive, subclassificações dentro de cepas regionais, também conhecidas como *clonets* (TIBAYRENC; AYALA, 1991). Desta forma, variações geográficas podem interferir na sensibilidade dos testes (UMEZAWA et al., 2004; VERANI et al., 2009). De fato, 49 amostras positivas foram erroneamente classificadas como negativas por esta molécula, 44 das quais foram oriundas de diferentes regiões geográficas do Brasil, 2 do México, 2 da Nicarágua e 1 da Argentina. Para as demais moléculas os resultados falso-

---

negativos ocorreram em sua maioria em amostras oriundas de PE, localidade que participou com o maior contingente amostral. Uma alternativa para aumentar a sensibilidade da molécula IBMP-8.2 seria através da construção de novas quimeras, inserindo fragmentos repetitivos de outras proteínas do *T. cruzi*, principalmente daquelas que são mais conservadas. Quanto à especificidade foi verificado que não houve diferença significativa entre os quatro PRP, sendo os resultados superiores a 99,42%. As amostras que apresentaram resultados falso-positivos, independentemente da quimera utilizada, foram avaliadas como negativas para leishmaniose através de kit de imunofluorescência, indicando que este estado sorológico não ocorreu em virtude de reações cruzadas com o gênero *Leishmania spp.* Resultados semelhantes foram reportados por Houghton et al. (1999) ao encontrarem sensibilidade de 99,6% e especificidade de 99,3% para um antígeno quimérico composto por fragmentos das proteínas TcD, TcE, PEP e TcLo1.2, utilizando 240 amostras positivas e 149 negativas para a doença de Chagas. Outro estudo, utilizando um antígeno quimérico chamado CP2, mostrou valores de sensibilidade de 98,6% e especificidade de 99,4%, apesar dos autores terem avaliado somente 141 amostras positivas e 164 negativas para a doença de Chagas (CAMUSSONE et al., 2009). Mais recentemente, Hernández et al. (2010) ao estudarem a quimera TcBDE, demonstraram sensibilidade de 99,3% em 165 amostras positivas para a doença de Chagas e especificidade de 100% em 216 amostras negativas. Apesar dos resultados serem semelhantes aos nossos, é importante salientar que o nosso número amostral (positivos = 857 e negativos = 689) foi maior do que o utilizado por eles utilizado por eles, refletindo maior confiabilidade aos resultados.

O PRP-IBMP-8.2, por conta de ter atingido sensibilidade de 94,28%, apresentou a maior proporção de erro total (3,36%) e, conseqüentemente, menor exatidão (96,64%). A exatidão reflete a capacidade do teste em fornecer resultados corretos, ou seja, é capaz de determinar o verdadeiro valor do que está sendo avaliado. Esta é uma ferramenta poderosa de análise ao considerar em um mesmo parâmetro os resultados das amostras positivas e das negativas. O PRP-IBMP-8.4 apresentou exatidão de 99,61% (com 0,39% de erro total), indicando ser um antígeno seguro para o diagnóstico do *T. cruzi*. Os antígenos IBMP-8.1 e 8.3, apesar de apresentarem valores de exatidão estatisticamente inferiores aos obtidos para o IBMP-8.4, possuem valores superiores a 98%, indicando que também podem ser utilizados no diagnóstico da doença de Chagas. Estes dados são corroborados pela determinação do índice J, o qual também avalia a precisão de um teste diagnóstico levando em conta os valores de sensibilidade e especificidade. De acordo com ele, a molécula que apresentou o melhor

---

desempenho para diagnóstico foi a IBMP-8.4 (99,3%), seguida pela IBMP-8.3 (97,8%), IBMP-8.1 (96,9%) e IBMP-8.2 (93,8%).

Avaliar um teste diagnóstico utilizando somente estes parâmetros é insuficiente para mensurar a influência que os resultados irão exercer na decisão clínica, pois um teste só será útil apenas se os seus resultados modificarem a probabilidade de ocorrência ou não de uma doença (CARNEIRO, 2001; FERREIRA; MORAES; BECK, 2007). Daí a determinação das razões de verossimilhança (RV), as quais mostram quão mais ou menos um determinado resultado num teste favorece ou não um diagnóstico. Se a RV tem um valor elevado, o diagnóstico torna-se muito mais provável. Por outro lado, se a RV for perto de zero, o diagnóstico torna-se improvável (PAULO et al., 2004). Portanto, as RV definem a relação entre a probabilidade de um dado resultado na população com a doença alvo e a probabilidade desse mesmo resultado entre os sadios. Nos casos em que um teste apresenta especificidade igual a 100%, a determinação da RV+ torna-se matematicamente impossível, uma vez que o denominador da fórmula contém a equação “1-Esp”, como ocorrido para o PRP-IBMP-8.4. Nesta situação a alternativa de mensuração baseia-se na estimativa dos valores da RV subtraindo um determinado valor dos parâmetros de sensibilidade e especificidade (RODRÍGUEZ ARTALEJO et al., 1990). Como utilizamos duas casas decimais para expressar os parâmetros de desempenho nesta fase do estudo, então subtraímos 0,05 de cada um deles. Desta maneira, o PRP-IBMP-8.4 apresenta RV+ estimado de 1986 indicando que um indivíduo com doença de Chagas apresenta aproximadamente 1986 vezes mais probabilidade de ser diagnosticado com a doença caso seja submetido a um teste usando esta molécula. Para os outros antígenos esta probabilidade reduz para 674 para o PRP-IBMP-8.2, 217 para o PRP-IBMP-8.2 e 168 para o PRP-IBMP-8.1. Em relação aos indivíduos negativos o mesmo raciocínio pode ser aplicado. O valor de 0,007 encontrado para a RV- na molécula IBMP-8.4 indica que um indivíduo positivo possui probabilidade muito baixa de ser diagnosticado como negativo, caso seja submetido ao exame. Para as moléculas IBMP-8.3, 8.1 e 8.2 os valores foram de 0,021, 0,026 e 0,057, respectivamente. A análise combinada dos valores de RV+ e RV- é realizada através da relação RV+/RV-, também conhecida como Odds Ratio Diagnóstico (ORD), e tem sido bastante utilizada em estudos de meta-análise (COSTA; MARQUES-SILVA; MORELI, 2014; GREENBERG et al., 2010; HASSAN et al., 2011; ZHANG et al., 2015). Assim, para a molécula IBMP-8.1, 8.2 e 8.3 foram encontrados valores de ORD de 6.499, 3.771 e 32.068, respectivamente. Quanto ao PRP-IBMP-8.4 o valor estimado de ORD foi de 283.571, corroborando com os resultados encontrados pela análise

---

do índice J de que a molécula IBMP-8.4 foi a que apresentou o melhor desempenho para o diagnóstico da doença de Chagas, seguida pela IBMP-8.3, 8.1 e 8.2.

A determinação das razões de verossimilhança e dos respectivos ORD é uma importante ferramenta no estudo de Fase II, pois estes parâmetros não são dependentes da prevalência da doença na população, sendo, portanto, mais estáveis. Uma característica inerente do estudo de Fase II é a utilização de amostragem controlada tendo-se conhecimento prévio do perfil sorológico das amostras, o que torna inviável a determinação dos valores preditivos de um teste bem como das chances (*odds*) pré e pós-teste, os quais são indicados apenas em estudos de Fase III.

### **8.9 Sinergia entre os PRP-IBMP: misturas equimolares**

A combinação de dois ou mais antígenos recombinantes na matriz sólida foi avaliada por muitos autores e verificado aumento significativo da sensibilidade sem perda da especificidade (CAMUSSONE et al., 2009; FRASCH et al., 1991; UMEZAWA et al., 2003). Com objetivo de avaliar se os achados descritos por estes autores seriam encontrados empregando os PRP-IBMP, realizamos diversos ensaios utilizando todas as possibilidades de misturas equimolares dos nossos antígenos, sendo verificado que, para qualquer uma das possibilidades avaliadas, os valores de IR para as amostras positivas foram estatisticamente inferiores àqueles obtidos quando as proteínas foram utilizadas isoladamente. Além disso, muitos dos valores de IR encontrados para as amostras negativas apresentaram sinal estatisticamente superior àqueles encontrados quando os antígenos foram avaliados isoladamente. No entanto, a despeito destas diferenças, a análise dos intervalos de confiança a 95% revelou não existir diferença estatisticamente significativa nos parâmetros de desempenho quando as microplacas foram sensibilizadas com antígenos isolados ou em distintas combinações. Uma desvantagem da utilização de misturas antigênicas refere-se à possibilidade de antígenos individuais competirem uns com os outros pelos sítios de ligação, levando a diminuição da sensibilidade (KENNY; DUNSMOOR, 1983), o que não foi o nosso caso. Desta maneira, verificamos que os PRP-IBMP, quando utilizados em misturas equimolares, não apresentam vantagens quando comparados à sua utilização isolada, representando simplicidade diagnóstica e redução de custos.

### 8.10 Reações cruzadas

Para avaliação das reações cruzadas a estimativa da distribuição binominal negativa indicou que, para um grupo de 100 amostras positivas para qualquer outra doença, haveria 5% de probabilidade de pelo menos uma delas apresentar reatividade cruzada para os antígenos IBMP. Neste caso, o total de amostras cedidas para realização do estudo foi de 1411 sendo, ao final, utilizadas 1079, pois 332 (23,5%) não se enquadraram nos critérios de inclusão pré-estabelecidos. Neste caso, por se tratar de uma amostragem de conveniência e dada a dificuldade de obtenção de soro, os grupos foram compostos por quantitativos que variaram de 15 para rubéola até 160 para HBV. O nosso número amostral foi superior aos utilizados na literatura, como pode ser conferido nos trabalhos de Camussone et al. (2009) (n=15), Gadelha et al. (2003) (n=32), Peralta et al. (1994) (n=37) e Saba et al. (2013) (n=464). As amostras positivas para leishmaniose representaram o grupo mais importante para verificação de reações cruzadas em virtude de similaridades antigênicas com o *T. cruzi* (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). Para esta finalidade foram cedidas 444 amostras, das quais 65,5% (n=291) foram excluídas do estudo por não preencherem os critérios de inclusão pré-definidos. Este fato demonstra claramente a ausência de metodologia sorológica capaz de diferenciar a infecção causada pela leishmaniose da doença de Chagas, principalmente em áreas de co-endemicidade. A quantidade geral de amostras que reagiram com os PRP-IBMP foi baixa, variando de 4 amostras para o IBMP-8.4 a 8 para o IBMP-8.2. As amostras que sofreram reação cruzada não foram coincidentes para as quatro moléculas, exceto uma amostra positiva para HTLV oriunda do HEMOPE, que foi reconhecida pelas quatro moléculas, apesar de ser negativa nos testes utilizados como padrão-ouro. Esta amostra, em específico, foi submetida à reação de Western blot (TESA blot), tendo resultado negativo. Além disso, esta e as demais amostras que apresentaram reação cruzada em qualquer uma das moléculas (exceto as amostras positivas para leishmaniose) apresentaram resultado negativo ao serem submetidas à imunofluorescência indireta para leishmaniose. Com exceção para o grupo de amostras positivas para esquistossomose analisado pela molécula IBMP-8.3, que apresentou IR de 0,57, todos os demais grupos apresentaram valores abaixo de 0,43, sendo compatíveis com os valores encontrados para as amostras negativas analisadas no estudo de Fase II. Dados aos baixos índices de reação cruzada e dos valores dos IR, fica evidente que os quatro antígenos podem ser utilizados em áreas de co-endemicidade com doença de Chagas,

---

suprindo principalmente a demanda de testes diagnósticos para diagnóstico diferencial com espécies *Leishmania* spp.

### 8.11 Concordância de desempenho com kits comerciais

A avaliação do desempenho de um teste diagnóstico é realizada por meio da determinação de parâmetros de desempenho usando amostragem representativa do agravo, por meio dos ensaios de reprodutibilidade e verificação de reação cruzada com outras patologias. No entanto, a comparação dos resultados com kits comercialmente disponíveis representa um desafio para o teste em estudo, uma vez que estes já foram aprovados por órgãos regulamentares e o seu desempenho comprovado para uso em amostras com sorologia desconhecida. Apesar deste tipo de análise ser recomendada para os estudos de Fase III (VRAY, 2015), resolvemos fazê-lo na Fase II com objetivo de verificar se nossos antígenos possuem desempenho semelhante aos kits legalmente reconhecidos para uso em amostras populacionais. Como forma de minimizar distorções e adequar a análise à Fase II, utilizamos a mesma amostragem para os PRP-IBMP e para os kits Gold Elisa Chagas (REM Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) e Pathozyme<sup>®</sup> Chagas (Omega Diagnostics, Escócia, Reino Unido). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de sensibilidade dos PRP-IBMP e os dos kits empregados, exceto para o PRP-IBMP-8.2 que mostrou-se inferior quando comparado ao Gold Elisa Chagas e ao Pathozyme<sup>®</sup> Chagas. Em relação à especificidade, o Pathozyme<sup>®</sup> Chagas apresentou valores estatisticamente inferiores aos antígenos IBMP, sendo, inclusive, inferior ao encontrado para o Gold Elisa Chagas. De acordo com o índice J, o PRP-IBMP apresentou valor superior ao encontrado para os dois kits comerciais, apesar da exatidão não diferir estatisticamente com o valor encontrado para o Gold Elisa Chagas. Considerando a análise do índice J o PRP-IBMP-8.4 é classificado como a melhor molécula para o diagnóstico a doença de Chagas, seguido pelo kit Gold Elisa Chagas, o PRP-IBMP-8.1, o PRP-IBMP-8.3, o PRP-IBMP-8.2 e o kit Pathozyme<sup>®</sup> Chagas. Resultados fornecidos pelo ORD confirmam os resultados encontrados para a molécula IBMP-8.4 (283.571). No entanto, para os demais testes o melhor resultado foi observado para o PRP-IBMP-8.3 (32.071), seguido pelo kit Gold Elisa Chagas (30945), pelo PRP-IBMP-8.1 (6.721), pelo PRP-IBMP-8.2 (3.727) e pelo Pathozyme<sup>®</sup> Chagas (173). O desempenho inferior demonstrado para o pelo Pathozyme<sup>®</sup> Chagas deve-se provavelmente aos antígenos usados para o diagnóstico. De fato, o desempenho de um kit depende da matriz usada, apresentando



bons resultados em uma área geográfica e não em outra (JACOBSON, 1998). Este fato torna-se mais evidente quando o teste é usado para identificação de doenças causadas por patógenos com elevado polimorfismo genético e variação antigênica, como é o caso do *T. cruzi*. Por outro lado, o Gold Elisa Chagas, apesar de apresentar desempenho inferior aos PRP-IBMP-8.4 e 8.3, demonstrou ser capaz de identificar corretamente as amostras durante os ensaios realizados. Este kit utiliza em sua matriz antígenos recombinantes e lisado do parasita proveniente de cepas brasileiras, daí o bom desempenho. Talvez seja esta a explicação deste kit ter atingido valor significativamente mais elevado (5,15) quando comparado com os outros testes. Apesar das diferenças encontradas, a correlação de Spearman revelou valores acima de 0,80 quando as quatro moléculas comparadas com os kits comerciais, indicando boa correlação entre eles, a qual foi, provavelmente, decorrente do elevado número de amostras utilizadas. Quanto às reações cruzadas foi observado que os PRP-IBMP apresentaram resultados semelhantes aos encontrados pelo Gold Elisa Chagas (0,43%), entretanto inferiores ao encontrado pelo Pathozyme<sup>®</sup> Chagas (1,5%), o qual apresentou reatividade cruzada para HCV, HTLV e sífilis, mas não para *Leishmania* spp. Os índices de reatividade encontrados para os distintos grupos de doenças infecto-parasitárias ficaram abaixo de 0,40, sendo semelhante ao encontrado pelos nossos antígenos.

De acordo com as recomendações sugeridas pela Nota Técnica N°03/06 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), os kits diagnósticos para a doença de Chagas para triagem sorológica devem apresentar sensibilidade e especificidade iguais ou maiores que 99% e 97%, respectivamente, diminuindo a possibilidade de transfusão de amostras com resultados falso-negativos. Os resultados encontrados pelo nosso grupo para o PRP-IBMP-8.4 cumprem com o exigido pela referida Nota Técnica, demonstrando que esta molécula pode ser usada tanto na triagem sorológica quanto para diagnóstico laboratorial da infecção causada pelo *T. cruzi*. Conforme pode ser conferido na Figura 41, os demais PRP-IBMP e o Gold Elisa Chagas, por não atingirem sensibilidade superior a 99%, devem ser utilizados somente em diagnóstico laboratorial. Por outro lado, o Pathozyme<sup>®</sup> Chagas, em virtude dos parâmetros encontrados, deve ser utilizado com cautela no Brasil, pois não cumpriu com o exigido pela Nota Técnica quando uma amostragem mais significativa foi utilizada. Vale salientar que o painel sorológico utilizado pela Nota Técnica foi composto por 152 amostras, estando inclusas neste quantitativo as amostras positivas e negativas para a doença de Chagas assim como amostras positivas para outras doenças. Assim, de acordo com os resultados encontrados, as moléculas IBMP apresentaram desempenho superior ou igual quando comparadas à kits comerciais

---

podendo ser utilizadas para o diagnóstico da doença de Chagas. Além disso, o PRP-IBMP-8.4 pode também ser utilizado em triagem sorológica de bancos de sangue.

### 8.12 Análise dos resultados inconclusivos

A fim de cumprir com os critérios de inclusão e exclusão definidos neste estudo, as amostras cedidas pelas Instituições parceiras foram reavaliadas quanto a presença ou ausência de anticorpos anti-*T. cruzi*. Desta maneira, as 81 (8,6%) amostras positivas que apresentaram resultados inconclusivos nos testes usados como padrão-ouro foram excluídas da análise do potencial diagnóstico dos PRP-IBMP. No entanto, estas amostras foram avaliadas quanto à sua capacidade de serem reconhecidas pelos antígenos IBMP quando os testes foram conduzidos isoladamente ou em combinação de dois ou mais testes. Do total de amostras inconclusivas foi verificado através da análise de interseção de conjuntos que 25 (30,9%) apresentaram positividade na análise combinada dos PRP-IBMP-8.1, 8.3 e 8.4. Entretanto, 11 amostras (13,6%) não foram reconhecidas por nenhuma das moléculas. Valores intermediários de positividade foram obtidos quando outras possibilidades de combinação foram testadas. De acordo com Guzmán-Gómez et al. (2015) as diferenças na capacidade de reconhecimento podem ser devidas ao número e natureza dos antígenos. Outros fatores que dificultam o reconhecimento dos antígenos pelos anticorpos séricos baseiam-se na conservação das amostras séricas (desnaturação dos anticorpos por sucessivos congelamentos e descongelamentos) e se o sistema imunológico dos indivíduos infectados produziu quantidades mínimas de anticorpos capazes de serem detectados por testes sorológicos (FURUCHÓ et al., 2008). Com base em nossos resultados verificamos que, em virtude do pequeno número amostral ter sido empregado, a utilização combinada dos PRP-IBMP-8.1, 8.3 e 8.4 sugere que seja uma alternativa para redução do número de casos inconclusivos.

---

## 9 CONCLUSÕES

- 1) Os PRP-IBMP são proteínas quiméricas com estrutura secundária simples com baixo estado de oligomerização em tampão carbonato de sódio (50 mM, pH 9,6), indicando ser este o sistema mais apropriado para sensibilização de microplacas utilizando os PRP-IBMP;
- 2) A utilização do soro fetal bovino representou incremento na capacidade discriminatória entre amostras positivas e negativas quando utilizado o PRP-IBMP-8.1, não ocorrendo para os demais antígenos;
- 3) A padronização do ELISA indireto revelou máxima capacidade discriminatória entre amostras negativas e positivas para a doença de Chagas crônica quando utilizado 12,5 ng do antígeno IBMP-8.2 e 25 ng dos antígenos IBMP-8.1, 8.3 e 8.4 por cavidade, aliada a diluição de 1:40.000 para o anticorpo conjugado e 1:100 para as amostras séricas utilizando o PBS-Tween 0,05% para os testes realizados com as moléculas IBMP-8.2, 8.3 e 8.4 e PBS-Tween 0,05% acrescido à SFB 2,5% para os ensaios realizados com a molécula IBMP-8.1;
- 4) Os PRP-IBMP-8.3 e 8.4 mantêm sua capacidade reativa por até 12 meses quando sensibilizados em microplacas;
- 5) Os resultados obtidos utilizando os PRP-IBMP são precisos e reprodutíveis, indicando que na plataforma utilizada (ELISA) eles podem ser usados com segurança por outros operadores;
- 6) Os valores de AUC encontrados nas Fases I e II indicam que os PRP-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;
- 7) O PRP-IBMP-8.4 apresentou o melhor desempenho diagnóstico, seguido do PRP-IBMP-8.3, 8.1 e 8.2;
- 8) A utilização isolada de um único PRP-IBMP representou simplicidade diagnóstica e melhor operacionalização quando comparada ao uso de misturas equimolares contendo dois ou mais antígenos;
- 9) Os PRP-IBMP apresentam baixos índices de reação cruzada, sugerindo a sua utilização em regiões geográficas de co-endemicidade da doença de Chagas com outras doenças infecto-parasitárias;

- 
- 10) Os PRP-IBMP podem ser utilizados como testes no diagnóstico sorológico da doença de Chagas;
  - 11) O PRP-IBMP-8.4 pode ser utilizado em triagem sorológica em banco de sangue;
  - 12) A utilização isolada dos PRP-IBMP-8.1, 8.3 e 8.4 possui potencial para ser usada na redução do número de casos inconclusivos;
  - 13) A análise conjunta dos experimentos realizados neste estudo revela que o PRP-IBMP-8.4 foi o antígeno que apresentou a maior capacidade diagnóstica para a doença de Chagas utilizando amostras séricas provenientes de diversas regiões geográficas do Brasil e de outros países endêmicos, maior estabilidade quando sensibilizado em fase sólida, menor índice de reatividade cruzada e o que forneceu o menor quantitativo de resultados inconclusivos, sendo eleito para a continuidade dos estudos de Fase III.

## 10 PERSPECTIVAS

- 1) Realizar o estudo de Fase III de outras regiões geográficas do Brasil e da América Latina;
- 2) Avaliar o desempenho dos PRP-IBMP em outras plataformas diagnósticas, como testes imunocromatográficos, testes por microarranjo líquidos e dispositivos *point-of-care*;
- 3) Avaliar o desempenho dos PRP-IBMP em diagnosticar a doença de Chagas em indivíduos imunossuprimidos;
- 4) Analisar o desempenho dos PRP-IBMP como marcador de evolução clínica ou de cura parasitológica;
- 5) Avaliar o potencial diagnóstico dos PRP-IBMP na doença de Chagas em cão.

---

## REFERÊNCIAS

- ABATE, T. et al. Cloning and partial characterization of a 28 kDa antigenic protein of *Trypanosoma cruzi*. **Biological Research**, Santiago, v. 26, n. 1-2, p. 121-130, 1993.
- 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, out./dez. 1990.
- ALMEIDA, I. C. et al. GPI-anchored glycoconjugates from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes are recognized by lytic anti-alpha-galactosyl antibodies isolated from patients with chronic Chagas' disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 443-447, fev. 1994.
- ALVIAREZ, Y. et al. Estandarización de la técnica de aglutinación directa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Biomédica**, Bogotá, v. 34, n. 2, p. 308-317, abr./jun. 2014.
- AMATO NETO, V. et al. Outras formas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 29, supl. 1, p. 115-129, jan./jun. 2000.
- ANANDARAO, R. et al. A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 41, n. 1, p. 136-147, May 2005.
- ANDRADE, S. G. et al. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 8, p. 948-956, dez. 2011.
- ANGHEBEN, A. et al. Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. **Euro Surveillance**, Saint-Maurice, v. 16, n. 37, p. 19969, Sept. 2011.
- ARAÚJO, F. G. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 53, n. 1, p. 179-185, July 1986.
- AVILA, H. A. et al. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 211-221, Oct. 1991.
-

- 
- AVILA, H. A. et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 9, p. 2421-2426, Sept. 1993.
- AZNAR, C. et al. Prevalence of anti-R-13 antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology Immunology**, Amsterdam, v. 12, n. 3/4, p. 231-238, Dec. 1995.
- AZUAJE, F. J.; RAMIREZ, J. L.; DA SILVEIRA, J. F. In silico, biologically-inspired modelling of genomic variation generation in surface proteins of *Trypanosoma cruzi*. **Kinetoplastid Biology Disease**, London, v. 6, p. 6, July 2007.
- BALOUZ, V. et al. Mapping antigenic motifs in the trypomastigote small surface antigen from *Trypanosoma cruzi*. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 22, n. 3, p. 304-312, Mar. 2015.
- BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiasis. **Lancet**, London, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, Nov. 2003.
- BAYER-SANTOS, E. et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 12, n. 2, p. 883-897, Feb. 2013.
- BAYONA, J. C. et al. SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. **Molecular and Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 10, n. 12, p. M110.007369, Dec. 2011.
- BELLUZO, M. S. et al. Favorably orienting recombinant proteins to develop amperometric biosensors to diagnose Chagas' disease. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 408, n. 1, p. 86-94, Jan. 2011.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 49, n. 5, p. e52-e54, Sept. 2009.
- BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. **Advances in Parasitology**, London, v. 75, p. 19-47, 2011.
- BERRIZBEITIA, M. et al. Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains. **Transfusion Medicine**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 419-431, Dec. 2006.
- BHATTACHARYYA, T. et al. Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 921-928, July 2010.
-

---

BLACKSELL, S. D. et al. The comparative accuracy of 8 commercial rapid immunochromatographic assays for the diagnosis of acute dengue virus infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, n. 8, p. 1127-1134, Apr. 2006.

BLANCHET, D. et al. First report of a family outbreak of Chagas disease in French Guiana and posttreatment follow-up. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 28, p. 245-250, Dec. 2014.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, supl. 3, p. 7-29, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Técnica nº 03/06 - Resultado da Avaliação dos “kits” para diagnóstico de doença de Chagas**. Brasília; 2006. Disponível em: <[http://www.biosys.com.br/data/jpf\\_article/12/file/avaliacaodoskitsdedoencadechagas.pdf](http://www.biosys.com.br/data/jpf_article/12/file/avaliacaodoskitsdedoencadechagas.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2014.

BRASIL, P. E. et al. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. **BioMed Central Infectious Diseases**, London, v. 10, p. 337, Nov. 2010.

BRENER, Z.; ALQUEZAR, A.; LUQUETTI, A. Normas de segurança para infecções acidentais com *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 26, n. 1, p. 129-130, jan./jun.1997.

BRENIÈRE, S. F. et al. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 3, p. 335-341, Mar. 1992.

BRENIÈRE, S. F. et al. Immune response to *Trypanosoma cruzi* shed acute phase antigen in children from an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, p. 503-507, jul. 1997.

BRENIÈRE, S. F. et al. Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 3, 289-295, abr. 2002.

BRITTO, C. et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. **Parasitology**, London, v. 110, pt. 3, p. 241-247, Apr. 1995.

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, Supl. 1, p. 122-135, jul. 2009.

BRUMPT, E. Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularis*, *Cimex boueti* et *Ornithodoros moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 5, n. 6, p. 360-367, 1912.

---



---

BRUTUS, L. et al. Le dépistage de l'infection congénitale par *Trypanosoma cruzi* en France métropolitaine. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 102, n. 5, p. 300-309, 2009.

BUCHOVSKY, A. S. et al. Trans-sialidase inhibition assay, a highly sensitive and specific diagnostic test for Chagas' disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, n. 1, p. 187-189, Jan. 2001.

BURNS, J. M. et al. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 4, p. 1239-1243, Feb. 1992.

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.

CAMANDAROBA, E. L., PINHEIRO LIMA, C. M. ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotop in the intragastric experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 97-103, mar./abr. 2002.

CAMARGO, M. E. et al. Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 192-204, jul./ago.1984.

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, June 2009.

CARRIER, Y. Globalization of Chagas disease (American trypanosomiasis): the situation in Europe and Belgium. **Bulletin et Mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belgique**, Bruxelles, v. 166, n. 10-12, p. 347-357, 2011.

CARNEIRO, A. V. Princípios de Seleção e Uso de Testes Diagnósticos : Propriedades Intrínsecas dos Testes. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, Lisboa, v. 20, n. 12, p. 1267-1274, 2001.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 57, n. 4, p. 953-994, Dec. 1993.

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, June 2010.

CETRON, M. S. et al. Evaluation of recombinant trypomastigote surface antigens of *Trypanosoma cruzi* in screening sera from a population in rural northeastern Brazil endemic for Chagas' disease. **Acta Tropica**, Basel, v. 50, n. 3, p. 259-266, Feb. 1992.

---

- 
- CHAGAS, C. Nova Tripanomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, 159-218, 1909a.
- CHAGAS, C. Neue Trypanosomen: Vorläufige Mitteilung. **Archiv für Schiffs- und Tropen-Hygiene**, Leipzig, v. 13, p. 120-122, 1909b.
- CHAN, K. et al. A Markov model to analyze cost-effectiveness of screening for severe combined immunodeficiency (SCID). **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 104, n. 3, p. 383-389, Nov. 2011.
- CHAPPUIS, F. et al. Validation of a rapid immunochromatographic assay for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection among Latin-American Migrants in Geneva, Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 8, p. 2948-2952, Aug. 2010.
- CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 1102-1107, Sept./Oct. 2012.
- CHIODINI, P. L. et al. The heat stability of Plasmodium lactate dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 101, p. 331-337, Apr. 2007.
- CHIPPAUX, J. P. et al. Sensitivity and specificity of Chagas Stat-Pak test in Bolivia. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 14, n. 7, p. 732-735, July 2009.
- CIMINO, R. O. et al. Immuno-enzymatic evaluation of the recombinant TSSA-II protein of *Trypanosoma cruzi* in dogs and human sera: a tool for epidemiological studies. **Parasitology**, London, v. 138, n. 8, p. 995-1002, July 2011.
- COOLEY, G. et al. High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 10, p. e316, Oct. 2008.
- CORDERO, E. M. et al. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 8, n. 7, p. 3642-3652, July 2009.
- COSTA, G. et al. A recombinant antigen and peptide line immunoassay (LIA) as an alternative diagnostic test for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, suppl. 1, p. 399, 1997.
- COSTA, V. G. DA; MARQUES-SILVA, A. C.; MORELI, M. L. A Meta-analysis of the diagnostic accuracy of two commercial NS1 antigen ELISA tests for early dengue virus detection. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e94655, Apr. 2014.
- COTRIM, P. C. et al. Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human chagasic sera. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 3, p. 519-524, Mar. 1990.
-

---

COTRIM, P. C. et al. Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 89-98, Apr. 1995.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, suppl 1, p. 113-122, out. 2007.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, suppl 1, p. 31-40, jul. 2009.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, Basel, v. 115, n. 1/2, p. 5-13, July/Aug. 2010.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, London, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, June 2010.

DA SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 286-291, June 2001.

DAROCHA, W. D. et al. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Parasitology Research**, Berlin, v. 88, n. 4, p. 292-300, Apr. 2002.

DE NOYA, B. A.; GONZÁLEZ, O. N. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 151, p. 94-102, Nov. 2015.

DE NOYA, B. A. et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 377-386, May 2015.

DE SOUZA, S. L.; CAMARGO, M. E. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American Trypanosomiasis serodiagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 8, n.6, p. 255-258, dez. 1966.

DE SOUZA, W.; SOUTO-PADRÓN, T. The paraxial structure of the flagellum of Trypanosomatidae. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 66, n. 2, p. 229-236, Apr. 1980.

DE SOUZA, A. A. et al. Epidemiologia de um caso de doença de Chagas na Ilha do Mosqueiro - Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 4, p. 187-192, out./dez. 1988.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, Cairo, v. 2009, p. 642502, Aug. 2009.

---

---

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./set.1989.

DIAS, J. C. **Doença de Chagas: clínica e terapêutica**. Brasília: Sucam: Ministério da Saúde, 1990. 94p.

DIAS, J. C. et al. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, supl. 2, p. 13-34, 2000.

DIAS, J. C.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 3, p. 375-379, maio/jun. 2011.

DIEZ, C. et al. Cardiovascular risk factors in chronic Chagas' disease are associated with a different profile of putative heart-pathogenic antibodies. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 26-33, Oct. 2006.

DI NOIA, J. M. et al. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 195, n. 4, p. 401-413, Feb. 2002.

DIPTI, C. A.; JAIN, S. K.; NAVIN, K. A novel recombinant multi-epitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. **Protein Expression and Purification**, Orlando, v. 47, n. 1, p. 319-328, May 2006.

DOCAMPO, R. et al. Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical Journal**, London, v. 310, n. pt. 3, p. 1005-1012, Sept. 1995.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nature reviews. Microbiology**, London, v. 3, n. 3, p. 251-261, Mar. 2005.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 14, n. 9, p. 882-888, 2008.

DOENÇA de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Boletim Epidemiológico**, Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 46, n. 21, 2015.

DUARTE, L. F. et al. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. **Colombia Médica**, Cali, v. 45, n. 2, p. 61-66, June 2014.

DUJARDIN, J. P. et al. The rising importance of *Triatoma rubrofasciata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 319-323, maio 2015.

DUNBAR, S. A.; JACOBSON, J. W. Application of the luminex LabMAP in rapid screening for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: A pilot study. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 46, n. 9, p. 1498-1500, Sept. 2000.

---

---

DURANTI, M. A et al. Trypanosoma cruzi: conformational preferences of antigenic peptides bearing the immunodominant epitope of the B13 antigen. **Experimental Parasitology**, New York, v. 93, n. 1, p. 38-44, Sept. 1999.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 208-218, jul. 2009.

ELIAS, M. C. et al. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 112, n. 1, p. 79-90, Jan. 2001.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, New York, v. 309, n. 5733, p. 409-415, July 2005.

EMMER, B. T et al. Identification of a palmitoyl acyltransferase required for protein sorting to the flagellar membrane. **Journal of Cell Science**, London, v. 122, pt. 6, p. 867-874, 2009.

ENGMAN, D. M. et al. A novel flagellar Ca<sup>2+</sup> - binding protein in trypanosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 31, p. 18627-18631, Mar. 1989.

FABBRO, D. L. et al. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 1-10, jan./fev. 2007.

FABBRO, D. L. et al. Humoral immune response against P2 $\beta$  from *Trypanosoma cruzi* in persons with chronic Chagas disease: its relationship with treatment against parasites and myocardial damage. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 84, n. 4, p. 575-580, Apr. 2011.

FEILIJ, H.; MULLER, L.; GONZALEZ CAPPA, S. M. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 18, n. 2, p. 327-330, Aug. 1983.

FERREIRA, A. W.; CAMARGO, M. E.; NAKAHARA, O. S. *Trypanosoma cruzi*: immunoperoxidase antibody test for serologic diagnosis. **Experimental Parasitology**, New York, v. 37, n. 2, p. 131-137, Apr. 1975.

FERREIRA, A. W. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 12, p. 4390-4399, Dec. 2001.

FERREIRA, A. W.; MORAES, S. L.; BECK, S. T. Parâmetros e Controle de Qualidade de Imunoensaios. In: VAZ, A.; TAKEI, K.; BUENO, E. (Org.). **Imunoensaios - Fundamentos e Aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 39-46.

---

---

FIFE, E. H.; MUSCHEL, L. H. Fluorescent-antibody technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 101, n. 3, p. 540-543, July 1959.

FOTI, L. et al. Viability study of a multiplex diagnostic platform for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 136-141, jul. 2009.

FRANK, M. et al. Prevalence and epidemiological significance of *Trypanosoma cruzi* infection among Latin American immigrants in Berlin, Germany. **Infection**, Munich, v. 25, n. 6, p. 355-358, Nov./Dec. 1997.

FRASCH, A. C.; REYES, M. B. Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 137-139, Apr. 1990.

FRASCH, A. C. et al. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 7, n. 6, p. 148-151, June 1991.

FURUCHÓ, C. R. et al. Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 1527-1533, Dec. 2008.

GADELHA, A. 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, V. S. et al. Synthesis of latex-antigen complexes from single and multiepitope recombinant proteins. Application in immunoagglutination assays for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Colloids and Surfaces B Biointerfaces**, Amsterdam, v.101, p. 384-391, Jan. 2013.

GARCIA, V. S. et al. Optimisation and standardisation of an immunoagglutination assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection based on latex-(recombinant antigen) complexes. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 37-46, Jan. 2014.

GARCIA, V. S. et al. Immunoagglutination test to diagnose Chagas disease: comparison of different latex-antigen complexes. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 19, n. 11, p. 1346-54, Nov. 2014.

GIL, J. et al. Reactividad del antígeno GST-SAPA de *Trypanosoma cruzi* frente a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y leishmaniasis. **Medicina**, Buenos Aires, v. 71, n. 2, p. 113-119, 2011.

GOLDBAUM, M.; BARRETO, M. L. Commentary: the contribution and example of Carlos Chagas. **International Journal of Epidemiology**, London, v. 37, n. 4, p. 697-698, Aug. 2008.

---

- 
- GOMES, Y. M. PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' disease. Biotechnological advances. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 66, n. 2, p. 107-119, May 1997.
- GOMES, M. L. et al., Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 60, n. 2, p. 205-210, Feb. 1999.
- GOMES, Y. M., LORENA, V. M.; 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, supl. 1, p. 115-121, jul. 2009.
- GONZALEZ, A. et al. Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 13, n. 16, p. 5789-5804, Aug. 1985.
- GONZALEZ, V. D. et al. Immunodiagnosis of Chagas disease: Synthesis of three latex-protein complexes containing different antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Colloids Surface B Biointerfaces**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 12-17, May 2010.
- GOTO, Y.; CARTER, D.; REED, S. G. Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 76, n. 9, p. 3967-3974, Sept. 2008.
- GOUBAU, P. et al. Confirmatory strategy of hepatitis C serology based on two screening assays in a diagnostic setting. **Acta Clinica Belgica**, Brussels, v. 52, n. 1, p. 31-35, 1997.
- GREENBAUM, J. A. et al. Towards a consensus on datasets and evaluation metrics for developing B-cell epitope prediction tools. **Journal of Molecular Recognition**, London, v. 20, n. 2, p. 75-82, Mar./Apr. 2007.
- GREENBERG, E. D. et al. Diagnostic accuracy of CT angiography and CT perfusion for cerebral vasospasm: a meta-analysis. **American Journal of Neuroradiology**, Baltimore, v. 31, n. 10, p. 1853-1860, Nov. 2010.
- GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R. D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 45, n. 1/2, p. 23-41, May 2000.
- GRUBER, A.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. **Experimental Parasitology**, New York, v. 76, n. 1, p. 1-12, Feb. 1993.
- GUEVARA, A. G. et al. Severe digestive pathology associated with chronic Chagas' disease in Ecuador: report of two cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 5, p. 389-392, set./out. 1997.
-

- 
- GULLO, C. E. et al. Formas digestivas da doença de Chagas e carcinogênese: um estudo de associação. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 146-150, abr. 2012.
- GUPTA, S. et al. Antigenicity and diagnostic potential of vaccine candidates in human Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e2018, Jan. 2013.
- 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, p. 466, Sept. 2015.
- HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M.; STEVENS, J. R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the “bat seeding” hypothesis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 136-141, Apr. 2012.
- HASSAN, C. et al. Appropriateness of the indication for colonoscopy: systematic review and meta-analysis. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, Cluj-Napoca, v. 20, p. 279-286, Sept. 2011.
- HEISE, N. et al. Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 28, p. 16877-16887, July 1996.
- HERNÁNDEZ, M. et al. Chimeric synthetic peptide as antigen for immunodiagnosis of HIV-1 infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 272, n. 1, p. 259-262, May 2000a.
- HERNÁNDEZ, M. et al. Antigenicity of chimeric synthetic peptides based on HTLV-1 antigens and the impact of epitope orientation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 276, n. 3, p. 1085-1088, Oct. 2000b.
- HERNÁNDEZ, P. et al. Highly effective serodiagnosis for Chagas’ disease. **Clinical and Vaccine Immunology**, New York, v. 17, n. 10, p. 1598-1604, Oct. 2010.
- HERNÁNDEZ MARIN, M. et al. Chimeric synthetic peptides from the envelope (gp46) and the transmembrane (gp21) glycoproteins for the detection of antibodies to human T-cell leukemia virus type II. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 289, n. 1, p. 7-12, Nov. 2001a.
- HERNÁNDEZ MARIN, M. et al. Chimeric synthetic peptides containing two immunodominant epitopes from the envelope gp46 and the transmembrane gp21 glycoproteins of HTLV-I virus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 289, n. 1, p. 1-6, Nov. 2001b.
- HERWALDT, B. L.; JURANEK, D. D. Laboratory-acquired malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis, and toxoplasmosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 48, n. 3, p. 313-323, Mar. 1993.
-



---

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: a New Terminology. **Nature**, London, v. 212, p. 1385-1386, May/June 1966.

HOBBS, R. Can heart failure be diagnosed in primary care? **British Medical Journal**, London, v. 321, n. 7255, p. 188-189, July 2000.

HOFFLIN, J. M. et al. Laboratory-acquired Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 81, n. 3, p. 437-440, 1987.

HOFT, D. F. et al., *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 57, n. 7, p. 1959-1967, July 1989.

HONIGBERG, B. M. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. **The Journal of Protozoology**, New York, v. 10, p. 20-63, Feb. 1963.

HORAN, P. K.; WHEELLESS, L. L. Quantitative single cell analysis and sorting. **Science**, New York, v. 198, n.4313, p. 149-157, Oct. 1977.

HOTEZ, P. J. et al., Chagas Disease: "The New HIV/AIDS of the Americas". **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e1498, May 2012.

HOUGHTON. R.; BENSON, D.; SKEIKY, Y. Multi-epitope peptide ELISA for the detection of serum antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated and untreated Chagas' disease. **Transfusion**, Arlington, v. 36, suppl. 9, p. S135, Jan. 1996a.

HOUGHTON. R.; BENSON, D.; SKEIKY, Y. A multi-epitope ELISA for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in RIPA confirmed and consensus positive sera. **Transfusion**, Arlington, v. 36, suppl 9, p. S14, May 1996b.

HOUGHTON, R. L. et al. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 179, n. 5, p. 1226-1234, May 1999.

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. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 181, n. 1, p. 325-330, Jan. 2000.

HOUGHTON, R. L. et al. Lateral flow immunoassay for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection with high correlation to the radioimmunoprecipitation assay. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 16, n. 4, p. 515-520, Apr. 2009.

IBAÑEZ, C. F. et al. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 27-33, July 1988.

IMAI, K. et al. Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, n. 1, p. 146-148, Jan. 2014.

---

---

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR MEDICAL ASSISTANCE TO TRAVELLERS.

**When hiking through Latin America, be alert to Chagas' disease.** Edição 2012.

Disponível em: <[https://www.iamat.org/assets/files/Be\\_Alert\\_to\\_Chagas\\_Disease.pdf](https://www.iamat.org/assets/files/Be_Alert_to_Chagas_Disease.pdf)>.

Acesso em: 19 set. 2014.

IRWIG, L. et al. Designing studies to ensure that estimates of test accuracy are transferable.

**British Medical Journal**, London, v. 324, n. 7338, p. 669-671, Mar. 2002.

IZQUIERDO, L. et al. Evaluation of a chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in a nonendemic setting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 7, p. 928-931, nov. 2013.

JACKSON, Y. et al. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 4, p. 601-603, Apr. 2009.

JACKSON, Y.; PINTO, A.; PETT, S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 212-218, Feb. 2014.

JACOBSON, R. Validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 17, n. 2, p. 487-506, 1998.

JAZIN, E. E. et al. *Trypanosoma cruzi* exoantigen is a member of a 160 kDa gene family. **Parasitology**, Londres, v. 110, pt. 1, p. 61-69, Jan. 1995.

KASSAI, B.; MANIERE, J.; NGUYEN, K. A. Qu'attendre d'un « test diagnostique » ? Les indices de précision des tests diagnostiques (1re partie). **Médecine**, Montrouge, v. 2, n. 8, p. 368-371, août 2006a.

KASSAI, B.; MANIERE, J.; NGUYEN, K. A. Qu'attendre d'un « test diagnostique » ? Les indices de précision des tests diagnostiques (2re partie). **Médecine**, Montrouge, v. 2, n. 9, p. 416-418, nov. 2006b.

KENNY, G. E.; DUNSMOOR, C. L. Principles, problems, and strategies in the use of antigenic mixtures for the enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 17, n. 4, p. 655-665, Apr. 1983.

KERNER, N. et al. *Trypanosoma cruzi*: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 73, n. 4, p. 451-459, Nov. 1991.

KESPER, N. et al. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 4, p. 862-867, Aug. 2000.

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.

---

---

KNIGHT, J. M. et al. Limited antigenic variation in the *Trypanosoma cruzi* candidate vaccine antigen TSA-1. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 708-712, Dec. 2014.

KOHL, L.; GULL, K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 1-9, May 1998.

KRANSDORF, E. P.; ZAKOWSKI, P. C.; KOBASHIGAWA, J. A. Chagas disease in solid organ and heart transplantation. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Hagerstown, v. 27, n. 5, p. 418-424, Oct. 2014.

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**, Washington, v. 33, n. 8, p. 2086-2090, Aug. 1995.

KRAUTZ, G. M. et al. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 58, n. 2, p. 137-143, Feb. 1998.

KRIEGER, M. A. et al. Expression and polymorphism of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a cytoplasmic repetitive antigen. **Experimental Parasitology**, New York, v. 70, n. 3, p. 247-254, Apr. 1990.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LAFAILLE, J. J. et al. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 127-136, June 1989.

LAL, R. B.; OTTESEN, E. A. Phosphocholine epitopes on helminth and protozoal parasites and their presence in the circulation of infected human patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 83, n. 5, p. 652-655, Sept./Oct. 1989.

LANAR, D. E.; MANNING, J. E. Major surface proteins and antigens on the different in vivo and in vitro forms of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 11, p. 119-131, Apr. 1984.

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.

LANGHI, D. M. et al. The application of latent class analysis for diagnostic test validation of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 6, n. 4, p. 181-187, Aug. 2002.

LELIE, P. N. et al. Sensitivity of HCV RNA and HIV RNA blood screening assays. **Transfusion**, Arlington, v. 42, n. 5, p. 527-536, May 2002.

---

---

LESÉNÉCHAL, M. et al. Cloning and characterization of a gene encoding a novel immunodominant antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 193-204, Aug. 1997.

LEVIN, M. J. et al. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 41, n. 5, p. 530-538, Nov. 1989.

LEVIN, M. J. et al. Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. **FEMS Microbiology Immunology**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 11-19, Dec. 1991.

LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z. A.; BARRAL-NETO, M. (Org.). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 345-378.

LUQUETTI, A. O. et al. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 46, n. 4, p. 265-271, Aug. 2003.

LUQUETTI, A. O.; SCHMUNIS, G. Diagnosis of *T. cruzi* infection. In: TELLERIA, J.; TIABYRENC, M. (Org.). **American Trypanosomiasis. Chagas Disease One Hundred Years of Research**. Madrid: Elsevier, 2010. p. 743-747.

MAGUIRE, J. H. et al. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. **Circulation**, Dallas, v. 75, n. 6, p. 1140-1145, June 1987.

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 (Ag163B6). **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 97, n. 3, p. 417-423, Sept. 1994.

MANCHESTER, K. L. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. **Biotechniques**, Natick, v. 20, n. 6, p. 968-970, Jun. 1996.

MANNE-GOEHLER, J.; REICH, M. R.; WIRTZ, V. J. Access to care for Chagas disease in the United States: a health systems analysis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 93, n. 1, p. 108-113, July 2015.

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**, Washington, 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, Dec. 2002.

---

---

MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. W.; RASSI JR, A. Pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: the role of coronary microvascular derangements. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, p. 536-541, set./out, 2013.

MARTIN, D. L. et al., Regional variation in the correlation of antibody and T-cell responses to *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 90, n. 6, p. 1074-1081, June 2014.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. D. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 7-31, 2003.

MARTINEZ, A. et al. Structural and molecular basis of the peroxynitrite-mediated nitration and inactivation of *Trypanosoma cruzi* iron-superoxide dismutases (Fe-SODs) A and B: disparate susceptibilities due to the repair of Tyr35 radical by Cys83 in Fe-SODB through intramolecular electron transfer. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 289, n. 18, p. 12760-12778, May 2014.

MARTINEZ DE TEJADA, B. et al. Dépistage et prise en charge de la maladie de Chagas congénitale à Genève. **Revue Médicale Suisse**, Chêne-Bourg, v. 5, n. 222, p. 2091-2096, oct. 2009.

MARTINS, C. et al. Identification of genes encoding hypothetical proteins in open-reading frame expressed sequence tags from mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 3, p. 1589-1630, 2011.

MASLOV, D. A.; PODLIPAEV, S. A.; LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 3, p. 397-402, abr. 2001.

MÉDECINS SANS FRONTIÈRES. Campaign for Access to Essential Medicines (2008). International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 3, p. 315-319, maio/jun. 2008.

MEIRA, W. S. et al. Use of the *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein to evaluate therapeutic efficacy following treatment of chronic chagasic patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 2, p. 707-712, Feb. 2004.

MILLER, M. B.; TANG, Y. W. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 22, n. 4, p. 611-633, Oct. 2009.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, supl. 1, p. 401-404, 1999.

MONCAYO, A.; LUQUETTI, A. O. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 489-495, out./dez. 1990.

---

- 
- MONTOYA, R.; DIAS, J. C.; COURA, J. R. Chagas disease in a community in southeast Brazil. I. A serologic follow-up study on a vector controlled area. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 269-274, set./out. 2003.
- MUIA, R. P. et al. Identification of glycoproteins targeted by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, a virulence factor that disturbs lymphocyte glycosylation. **Glycobiology**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 833-842, July 2010.
- MUÑOZ, J. et al. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 101, n. 11, p. 1161-1162, Nov. 2007.
- MURAKAMI, M. T. et al. Structural studies of the *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme: insights into enzyme dynamics and specificity. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 184, p.44-53, Dec. 2013.
- MURCIA, L. et al. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Madrid, v. 31, suppl. 1, p. 26-34, Feb. 2013.
- NAKAYASU, E. S. et al. Improved proteomic approach for the discovery of potential vaccine targets in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 11, n. 1, p. 237-246, Jan. 2012.
- NAKAZAWA, M. et al. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, n. 5, p. 1024-1027, Sept. 2001
- NISIDA, I. V. et al. A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three health institutions in São Paulo City, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 5, p. 305-311, set./out. 1999.
- NORRIS, K. A.; SCHRIMPF, J. E.; SZABO, M. J. Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 65, n. 2, p. 349-357, Feb. 1997.
- NUNES, M. C. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 62, n. 9, p. 767-776, Aug. 2013.
- OELEMANN, W. M. et al. A recombinant peptide antigen line immunoassay optimized for the confirmation of Chagas' disease. **Transfusion**, Arlington, v. 39, n. 7, p. 711-717, July 1999.
- OLIVEIRA, U. D. **Desenvolvimento de antígenos recombinantes para imunodiagnóstico de sífilis**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
-

---

OPPERDOES, F. R.; BORST, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 360-364, Aug. 1977.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chagas disease, Brazil. Interruption of transmission. **The Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 75, n. 19, p. 153-160, May 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control of Chagas disease**. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control and prevention of Chagas disease in Europe**. Geneva, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **The Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 90, n. 6, p. 33-43, Feb. 2015.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. **Chagas in the Americas for Public Health Workers**. Washington, 10 jul. 2014. Disponível em: < [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743)> . Acesso em: 22 out. 2015.

OTANI, M. M. et al. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. **Transfusion**, Arlington v. 49, n. 6, p. 1076-1082, Jun. 2009.

OUCHCHANE, L.; RABILLOUD, M.; BOIRE, J. Y. Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives. In: BEUSCART, R. (Org.). **Évaluation des méthodes d'analyse appliquées aux sciences de la vie et de la santé - Biostatistique**. Paris: Omniscience, 2009. p. 49-78.

PABA, J. et al. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 4, p. 1052-1059, Apr. 2004.

PAN, A. A. et al. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 165, n. 3, p. 585-588, Mar. 1992.

PARODI-TALICE, A. et al. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 881-886, July 2004.

PAULO, S. et al. Testes diagnósticos , probabilidades pré-teste e pós-teste e a sua utilização na prática clínica. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, Lisboa, v. 23, n. 9, p. 1187-1198, Sept. 2004.

PELLEQUER, J. L.; WESTHOF, E.; VAN REGENMORTEL, M. H. Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. **Methods in Enzymology**, New York, v. 203, p. 176-201, 1991.

---

---

PERALTA, J. M. et al. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 4, p. 971-974, Apr. 1994.

PEREIRA, V. R. et al. Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, Berlin, v. 96, n. 3, p. 154-161, June 2005.

PHOMMASONE, K. et al. Temperature and the field stability of a dengue rapid diagnostic test in the tropics. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 93, n. 1, p. 33-39, 8 July 2015.

PINTO, A. Y. et al. Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 5, p. 413-419, set./out. 2001.

PINTO, A.; PETT, S.; JACKSON, Y. Identifying Chagas disease in Australia: an emerging challenge for general practitioners. **Australian Family Physician**, Sidney, v. 43, n. 7, p. 440-442, July 2014.

PIRARD, M. et al. The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region. **Transfusion**, Arlington, v. 45, n. 4, p. 554-561, Apr. 2005.

PIRON, M. et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). **Transfusion**, Arlington, v. 48, n. 9, p. 1862-1868, Sept. 2008.

PIZARRO, J. C. et al. Crystal structure of the complex mAb 17.2 and the C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* P2 $\beta$  protein: implications in cross-reactivity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Fransico, v. 5, n. 11, p. e1375, Nov. 2011.

PONCE, C. et al. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas' disease by detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 10, p. 5065-5068, Oct. 2005.

PRAAST, G. et al. Evaluation of the Abbott ARCHITECT Chagas prototype assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 69, n. 1, p. 74-81, Jan. 2011.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Diseases**, New York, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001, Sept. 2011.

RANI, S.; GOGOI, P.; KUMAR, S. Spectrum of Newcastle disease virus stability in gradients of temperature and pH. **Biologicals**, London, v. 42, n. 6, p. 351-354, Nov. 2014.

RANI, S.; KUMAR, S. Evaluation of infectious bursal disease virus stability at different conditions of temperature and pH. **Biologicals**, London, v. 43, n. 6, p. 515-518, Nov. 2015.

---



---

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, London, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr. 2010.

RASSI Jr., A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

REED, S. G.; BADARO, R.; LLOYD, R. M. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 138, n. 5, p. 1596-1601, Mar. 1987.

REICHE, E. M. et al. Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 5, p. 750-756, Nov. 1998.

REMESAR, M. C. et al. Estimation of sensitivity and specificity of several *Trypanosoma cruzi* antibody assays in blood donors in Argentina. **Transfusion**, Arlington, v. 49, n. 11, p. 2352-2358, Nov. 2009.

RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 31, n.3, p. 301-314, maio/jun. 1998.

RIBEIRO, A. L. et al. Electrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi* seropositive and seronegative former blood donors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e2078, Feb. 2013.

ROCHA, G .M. et al. The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 154, n. 1, p. 89-99, Apr. 2006.

RODDY, P. et al. Field evaluation of a rapid immunochromatographic assay for detection of *Trypanosoma cruzi* infection by use of whole blood. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 6, p. 2022-2027, June 2008.

RODRÍGUEZ ARTALEJO, F. et al. Analysis of clinical decisions. **Medicina clínica**, Barcelona, v. 94, n. 9, p. 348-354, 10 Mar. 1990.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Chagas disease: an emerging food-borne entity? **The Journal of Infection in Developing Countries**, Alghero, v. 2, n. 2, 149-150, Apr. 2008.

ROSFJORD, E. C. et al. Analysis of antibody cross-reactivity in experimental American trypanosomiasis. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 76, n. 5, p. 698-702, Oct. 1990.

RUSSOMANDO, G. et al. Implementación y evaluación de un sistema localmente sustentable de diagnóstico prenatal que permite detectar casos de transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en zonas endémicas del Paraguay. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, supl. 2, p. 49-54, 2005.

---

---

RUSSOMANDO, G. et al. Shed acute-phase antigen protein in an ELISA system for unequivocal diagnosis of congenital Chagas disease. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, London, v. 10, n. 6, p. 705-707, Sept. 2010.

SABA, E. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* cross-reactive antibodies detected at high rate in non-exposed individuals living in non-endemic regions: seroprevalence and association to other viral serologies. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e74493, Sept. 2013.

SABINO, E. et al. Evaluation of Chagas INNOLIA assay as a confirmatory test for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, suppl. 1, p. 398, 1997.

SABORIO, J. L. et al. Isolation and characterization of paraflagellar proteins from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 7, p. 4071-4075, Mar. 1989.

SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. The architecture of diagnostic research. **British Medical Association**, London, v. 324, n. 7336, p. 539-541, Mar. 2002.

SAEZ-ALQUEZAR, A. Estudo multicêntrico: avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 26, n. 2, p. 343-374, jul./dez. 2007.

SALAMANCA-DEJOUR, D. et al. La maladie de Chagas (ou trypanosomose américaine) en France. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v. 42, n. 8, p. 344-348, août 2012.

SANTAMARÍA, A. L. et al. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay that utilizes the Tc13Tul antigen of *Trypanosoma cruzi* to monitor patients after treatment with benznidazole. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 76, n. 2, p. 197-205, June 2013.

SANTOS, L. et al. In-house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 1, p. 35-44, fev. 2012.

SANTOS, F. L. et al. Spatiotemporal analysis of reported cases of acute Chagas disease in the State of Pernambuco, Brazil, from 2002 to 2013. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 181-187, mar./abr. 2015.

SCHATTSCHEIDER, W. et al. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian patients. **Tropical and Geographical Medicine**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 210-218, July 1992.

SCHISTERMAN, E. F. et al. Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. **Epidemiology**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 73-81, Jan. 2005.

---

---

SCHMUNIS, G. A.; ZICKER, F.; MONCAYO, A. Interruption of Chagas' disease transmission through vector elimination. **Lancet**, New York, v. 348, n. 9035, p. 1171, Oct. 1996.

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, supl. 1, p. 75-85, out. 2007.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 115, n. 1/2, p. 14-21, July/Aug. 2010.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. **Advances in Parasitology**, London, v. 42, p. 1-27, 1999.

SCHOFIELD, C. J. Biosystematics and evolution of the *Triatominae*. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, supl. 2, p. 89-92, 2000.

SHAH, K. et al. Chimeric synthetic peptides as antigens for detection of antibodies to HIV-1 and HIV-2. **East African Medical Journal**, Nairobi, v. 73, n. 1, p. 63-66, Jan. 1996.

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

SILBER, A. M. et al. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. **Experimental Parasitology**, New York. 85, n. 3, p. 225-232, Mar. 1997.

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.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. O *Trypanosoma cruzi*. In: SIQUEIRA-BATISTA, R.; CORRÊA, A. D.; HUGGINS, D. W. (Org.). **Moléstia de Chagas**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1996. p. 76-90.

SOARES, M. J. et al. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 75, n. 7, p. 522-527, 1989.

SOSA-ESTANI, S. et al. Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras, and Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, n. 5, p. 755-759, Nov. 2008.

SOUZA, W. de. Electron microscopy of trypanosomes - a historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 4, p. 313-325, jun. 2008.

---

---

SPIRO, A.; LOWE, M.; BROWN, D. A bead-based method for multiplexed identification and quantitation of DNA sequences using flow cytometry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4258-4265, Oct. 2000.

STEELE, L. S. et al. The sero-prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Latin American refugees and immigrants to Canada. **Journal of Immigrant and Minority Health**, New York, v. 9, n. 1, p. 43-47, Jan. 2007.

STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 60, n. 1, p. 25-32, Jan. 2008.

STEVENS, J.; GIBSON, W. The evolution of salivarian trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 225-228, mar./abr. 1999.

STEVENS, J. R. et al. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Parasitology**, London, v. 118, pt. 1, p. 107-116, Jan. 1999.

STEVENS, J. R. et al. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, London, v. 48, p.1-56, 2001.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasite and Vectors**, London, v. 7, p. 317, July 2014.

STORINO, R.; MILEI, J. (Org.). **Enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Mosby, 1994. 652 p.

STROUT, R. G. A method for concentrating hemoflagellates. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 48, p. 100, Feb. 1962.

TDR DIAGNOSTICS EVALUATION EXPERT PANEL. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature reviews. Microbiology**, London, v. 8, suppl. 12, p. S17-S29, Dec. 2010.

TEIXEIRA, D. E. et al. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. e1749, Aug. 2012.

TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. e0122938, Apr. 2015.

TÉLLES, S. et al. *Trypanosoma cruzi* and human ubiquitin are immunologically distinct proteins despite only three amino acid difference in their primary sequence. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 123-130, June 1999.

---

---

THOMAS, M. C. et al. Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 123, n. 3, p. 465-471, Mar. 2001.

THUY, N. T. et al Tandem repeat protein as potential diagnostic antigen for *Trypanosoma evansi* infection. **Parasitology Research**, Berlin, v. 110, n. 2, p. 733-739, Feb. 2012.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 7, n. 9, p. 228-232, Sept. 1991.

TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. **Kinetoplastid Biology and Disease**, London, v. 2, n. 1, p. 12, Oct. 2003.

TOSO M, A.; VIAL U, F.; GALANTI, N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. **Revista Médica de Chile**, Santiago, v. 139, n. 2, p. 258-266, feb. 2011.

UENO, Y. et al. A highly suspected case of chronic Chagas' heart disease diagnosed in Japan. **Japanese Circulation Journal**, Kyoto, v. 59, n. 4, p. 219-223, Apr. 1995.

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, Sept. 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. et al. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 1, p. 449-452, Jan. 2004.

UPSET. Visualization of Intersecting Sets. Disponível em: <http://vcg.github.io/upset>. Acesso em: 04 nov. 2015.

VALENTE, V. C. et al. Chagas disease in the Amazon Basin: association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with domestic pigs. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 35, n. 2, p. 99-103, Mar. 1998.

VALIENTE-GABIOUD, A. A. et al. Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of *Trypanosoma cruzi* FRA protein. **Experimental Parasitology**, New York, v. 127, n. 3, p. 672-679, Mar. 2011.

---

- 
- VELÁSQUEZ, E. et al. Autoantibodies give false positive reactions in the serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 87, n. 1, p. 35, Jan./Feb. 1993.
- VERA-CRUZ, J. M. et al. Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. **Parasitology Research**, Berlin, v. 89, n. 6, p. 480-486, Apr. 2003.
- VERANI, J. R. et al. Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, n. 3, p. 410-415, Mar. 2009.
- VERISSIMO DA COSTA, G. C. et al. The identification and characterization of epitopes in the 30-34kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of chagasic patients. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 80, p. 34-42, Mar. 2013.
- VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 2, p. 2762-292, 1911.
- VICCO, M. H. et al. Assessment of cross-reactive host-pathogen antibodies in patients with different stages of chronic Chagas disease. **Revista Española de Cardiología**, Barcelona, v. 66, n. 10, p. 791-796, oct. 2013.
- VOLLER, A. et al. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. **Lancet**, London, v. 1, n. 7904, p. 426-428, Feb. 1975.
- VRAY, M. **Cours Évaluation des Tests Diagnostiques**: les 3/4 phases de développement d'un test diagnostique. Instituto Pasteur, Paris, 2015.
- WAEGEMAN, H.; SOETAERT, W. z. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, n. 12, p. 1891-1910, Dec. 2011.
- WEN, J. J. et al. Serum proteomic signature of human chagasic patients for the identification of novel potential protein biomarkers of disease. **Molecular and Cell Proteomics**, Bethesda, v. 11, n. 8, p. 435-452, Aug. 2012.
- WHITING, P. et al. Sources of variation and bias in studies of diagnostic accuracy: a systematic review. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 140, n.3, p. 189-202, Feb. 2004.
- WHITING, P. et al. A systematic review classifies sources of bias and variation in diagnostic test accuracy studies. **Journal of Clinical Epidemiology**, Oxford, v. 66, n. 10, p. 1093-1104, Oct. 2013.
- WINCKER, P. et al. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 51, n. 6, p. 771-777, Dec. 1994.
-

YOU DEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, New York, v. 3, n. 1, p. 32-35, Jan. 1950.

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 7, n. 5, p. 620-634, May 2012.

ZARATE-BLADES, C. R. et al. Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 57, n. 2, p. 229-232, Feb. 2007.

ZHANG, Y. et al. Magnetic resonance imaging for N staging in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. **Thoracic Cancer**, Richmond, v. 6, n. 2, p. 123-132, Mar. 2015.

ZINGALES, B. et al. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 105-112, Jan. 1998.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, nov. 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 240-253, Mar. 2012.

---

## APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO 1

*Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 00(0), 2016, pp. 000–000  
doi:10.4269/ajtmh.15-0820  
Copyright © 2016 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

## Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests

Fred Luciano Neves Santos,\* Wayner Vieira de Souza, Michelle da Silva Barros, Mineo Nakazawa, Marco Aurélio Krieger, and Yara de Miranda Gomes

*Reference Laboratory for Chagas Disease, Aggeu Magalhães Research Center, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil; Department of Public Health, Aggeu Magalhães Research Center, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil; Carlos Chagas Institute–Molecular Biology Institute of Paraná, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, Brazil*

**Abstract.** There is a significant heterogeneity in reported performance of serological assays for Chagas disease diagnosis. The conventional serology testing in laboratory diagnosis and in blood banks is unsatisfactory because of a high number of inconclusive and misclassified results. We aimed to assess the quality of four commercially available enzyme-linked immunosorbent assay tests for their ability to detect *Trypanosoma cruzi* antibodies in 685 sera samples. Cross-reactivity was assessed by using 748 sera from patients with unrelated diseases. Initially, we found that the reactivity index against *T. cruzi* antigen was statistically higher in sera from Chagas disease patients compared with those from non-chagasic patients, supporting the notion that all evaluated tests have a good discriminatory ability toward the diagnosis of *T. cruzi* infection in patients in the chronic phase of the disease. Although all tests were similarly sensitive for diagnosing *T. cruzi* infection, there were significant variations in terms of specificity and cross-reactivity among them. Indeed, we obtained divergent results when testing sera from patient with unrelated diseases, particularly leishmaniasis, with the levels of cross-reactivity being higher in tests using whole *T. cruzi* extracts compared with those using recombinant proteins. Our data suggest that all four tests may be used for the laboratory diagnosis and routine blood screening diagnose for Chagas disease. We also emphasize that, despite their general good performance, caution is needed when analyzing the results when these tests are performed in areas where other diseases, particularly leishmaniasis, are endemic.

Disponível em: <http://ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.15-0820>



---

**APÊNDICE B – MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO 2****Performance assessment of four chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens based on antibody detection for diagnosis of chronic Chagas disease – Phase I Study**

Fred Luciano Neves Santos<sup>1</sup>, Paola Alejandra Fiorani Celedon<sup>2</sup>, Nilson Ivo Tonin Zanchin<sup>2,3</sup>, Tatiana A C Brasil<sup>3</sup>, Leonardo Foti<sup>2,3</sup>, Wayner Vieira de Souza<sup>1</sup>, Edmilson Domingos Silva<sup>4</sup>, Yara de Miranda Gomes<sup>1</sup>, Marco Aurélio Krieger<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Aggeu Magalhães Research Center, FIOCRUZ, Recife, Brazil; <sup>2</sup>Instituto de Biologia Molecular do Paraná, <sup>3</sup>Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ, Curitiba, Brazil; <sup>4</sup>Biomanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence: Fred Luciano Neves Santos, Reference Laboratory for Chagas Disease, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Professor Moraes Rego, S/N, Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil. CEP 50740-456. Tel +55(81)2101-2682. E-mail: [fred.santos@cpqam.fiocruz.br](mailto:fred.santos@cpqam.fiocruz.br)

**Abstract.** The performance of serologic tests in chronic Chagas disease diagnosis depends on the type and quality of the antigen preparations used to detect anti-*T. cruzi* antibodies. Whole cell *T. cruzi* extracts or recombinant proteins have shown variation in the performance and cross-reactivity. Synthetic chimeric proteins composed by fragments of repetitive amino acids of several different proteins have been previously shown to improve assay's performances to detect Chagasic infections. Here, we describe the production of four chimeric *T. cruzi* proteins and assessed their performance for diagnostic purposes. Circular dichroism spectra revealed absence of well-defined secondary structures and polydispersity evaluation by Dynamic Light Scattering revealed only minor aggregates in 50 mM carbonate-bicarbonate (pH 9.6), showing that it is an appropriate buffering system to sensitize the microplates. Serum samples from *T. cruzi* infected and non-infected individuals were used to assess the performance of these antigens to detect antibodies against *T. cruzi* by using both ELISA and a liquid bead array platform. The performance parameters (AUC, sensitivity, specificity, accuracy and J index) showed high diagnostic accuracy for all chimeric proteins to detect specific anti-*T. cruzi* antibodies and to differentiate seropositive from seronegative individuals. Our data suggest that the four chimeric proteins are eligible to phase II studies.

**Key words:** Recombinant chimeric protein, chronic Chagas disease, serologic diagnostic

---

---

**APÊNDICE C – MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO 3****Temperature and field stability of four chimeric proteins for chronic Chagas disease diagnosis**

Fred Luciano Neves Santos<sup>1</sup>, Paola Alejandra Fiorani Celedon<sup>2</sup>, Nilson Ivo Tonin Zanchin<sup>2,3</sup>, Tatiana A C Brasil<sup>3</sup>, Wayner Vieira de Souza<sup>1</sup>, Edmilson Domingos Silva<sup>4</sup>, Marco Aurélio Krieger<sup>2,3</sup>, Yara de Miranda Gomes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aggeu Magalhães Research Center, FIOCRUZ, Recife, Brazil; <sup>2</sup>Instituto de Biologia Molecular do Paraná, <sup>3</sup>Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ, Curitiba, Brazil; <sup>4</sup>Biomanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence: Fred Luciano Neves Santos, Reference Laboratory for Chagas Disease, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Professor Moraes Rego, S/N, Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil. CEP 50740-456. Tel +55(81)2101-2682. E-mail: [fred.santos@cpqam.fiocruz.br](mailto:fred.santos@cpqam.fiocruz.br)

---

---

**APÊNDICE D – MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO 4****Efficiency of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic Chagas disease – Phase II**

Fred Luciano Neves Santos<sup>1</sup>, Paola Alejandra Fiorani Celedon<sup>2</sup>, Edmilson Domingos Silva<sup>4</sup>,  
Wayner Vieira de Souza<sup>1</sup>, Leonardo Foti<sup>2,3</sup>, Nilson Ivo Tonin Zanchin<sup>2,3</sup>, Marco Aurélio  
Krieger<sup>2,3</sup>, Yara de Miranda Gomes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aggeu Magalhães Research Center, FIOCRUZ, Recife, Brazil; <sup>2</sup>Instituto de Biologia Molecular do Paraná, <sup>3</sup>Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ, Curitiba, Brazil; <sup>4</sup>Biomanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence: Fred Luciano Neves Santos, Reference Laboratory for Chagas Disease, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Professor Moraes Rego, S/N, Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil. CEP 50740-456. Tel +55(81)2101-2682. E-mail: [fred.santos@cpqam.fiocruz.br](mailto:fred.santos@cpqam.fiocruz.br)

---

---

**APÊNDICE E – MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO 5****A comparative performance of commercial enzyme immunoassay tests and chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic disease**

Fred Luciano Neves Santos<sup>1</sup>, Paola Alejandra Fiorani Celedon<sup>2</sup>, Edmilson Domingos Silva<sup>4</sup>,  
Wayner Vieira de Souza<sup>1</sup>, Leonardo Foti<sup>2,3</sup>, Nilson Ivo Tonin Zanchin<sup>2,3</sup>, Marco Aurélio  
Krieger<sup>2,3</sup>, Yara de Miranda Gomes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aggeu Magalhães Research Center, FIOCRUZ, Recife, Brazil; <sup>2</sup>Instituto de Biologia Molecular do Paraná, <sup>3</sup>Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ, Curitiba, Brazil; <sup>4</sup>Biomanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence: Fred Luciano Neves Santos, Reference Laboratory for Chagas Disease, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Professor Moraes Rego, S/N, Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil. CEP 50740-456. Tel +55(81)2101-2682. E-mail: [fred.santos@cpqam.fiocruz.br](mailto:fred.santos@cpqam.fiocruz.br)

---

## ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



Comitê de Ética  
em Pesquisa

**Título do Projeto:** Avaliação e validação do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do Trypanosoma cruzi”.

**Pesquisador responsável:** Yara de Miranda Gomes

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 17/04/2013

**Registro no CAAE:** 15812213.8.0000.5190

**Número do Parecer PlatBr:** 388.527

### PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 11 de fevereiro de 2018..

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 21 de março de 2016.

Coordenadora do CEP/CPqAM

Janaina Campos de Miranda  
Pesquisadora em Saúde Pública  
Coordenadora  
Mat. SIAPE 464777  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n  
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639  
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639  
Recife - PE - Brasil  
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

  
Centro de Pesquisas  
AGGEU  
MAGALHÃES

  
FIOCRUZ  
Ministério da Saúde