



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DO *Trypanosoma cruzi* PARA
DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS EM BANCOS DE SANGUE

EMILY FERREIRA DOS SANTOS

Salvador - Bahia

2020

IGM

EMILY FERREIRA DOS SANTOS

Avaliação de antígenos quiméricos do *Trypanosoma cruzi* para diagnóstico da doença de Chagas em bancos de sangue

2020

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DO *Trypanosoma cruzi* PARA
DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS EM BANCOS DE SANGUE**

EMILY FERREIRA DOS SANTOS

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

Orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão Reis

Salvador - Bahia

2020

"AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DO *Trypanosoma cruzi* PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS EM BANCOS DE SANGUE".

EMILY FERREIRA DOS SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 08 de dezembro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Liliane da Rocha Siriano

Dra. Liliane da Rocha Siriano
Biomédica
ZONOSSES/GO

Virginia M. Barros de Lorena

Dra. Virginia Maria Barros de Lorena
Pesquisadora
FIOCRUZ/PE

Isadora Siqueira

Dra. Isadora Cristina de Siqueira
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código
de Treinamento 001

Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz (IGM)

AGRADECIMENTOS

Todos os desafios que passei me deixaram com medo e apreensiva, questionamentos e inseguranças pairavam em minha mente durante os processos. Com a obtenção do título de mestre não foi diferente. Foi um caminho longo, com altos e baixos, mas sempre construtivo, não tenho palavras para descrever o quanto aprendi, não é possível mensurar o meu crescimento profissional e pessoal. Eu nunca estive sozinha na minha jornada, sempre ao meu lado esteve meus familiares, amigos, professores e, o mais importante, Deus. Então é impossível finalizar um ciclo sem agradecê-los.

Agradeço primeiramente a Deus, pois é o resplendor da glória e para Ele são todas as coisas. Se hoje eu estou aqui finalizando mais um ciclo foi por meio de sua permissão e capacitação, sua bondade em minha vida foi tão grande que permitiu a realização do sonho de infância, ser cientista. Ao contrário do que diziam, o conhecimento não me afastou de ti, apenas me mostrou o Senhor que sirvo, a ciência está em ti e a natureza revela a sua existência. E por meio desta oportunidade que me deu, quero servir a outros, passar os meus conhecimentos e habilidades para que sejam uteis e ajudar a todos aqueles que precisam. A minha família, não tenho como expressar a minha gratidão. A minha mãe Eubene, minha tia Eube e minha avó Nildes, obrigada por serem meu porto seguro, por me ajudar a manter o foco e não ter deixado eu desistir, tudo o que sou hoje foi por meio dos seus conselhos. Ao meu pai por ser um exemplo de esforço, responsabilidade e determinação. Aos meus amigos e irmãos que sempre me apoiaram. De maneira direta ou indireta, todos foram importantes na minha construção.

Eu não poderia deixar de agradecer a meu orientador Dr. Fred Luciano, por ter me recebido no grupo, sua atenção e paciência para ensinar foram cruciais para o meu desenvolvimento durante o curso. Sempre busco extrair e guardar o melhor de cada pessoa que passa por minha vida e o senhor é o profissional que eu quero ser um dia: responsável, competente e que trata com cordialidade todos a sua volta. Ao grupo Tecnologia Diagnóstica, principalmente aos meus amigos Ângelo, Leonardo, Natália e Ramona, por terem tornada essa experiência mais leve e divertida. A FIOCRUZ, ao LASP, todos os colaboradores e Instituições parceiras.

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

RESUMO

INTRODUÇÃO: A doença de Chagas (DC) está entre as dez principais causas de inaptidão para doação de sangue. Os hemocentros utilizam testes para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* através de métodos imunoenzimáticos (ELISA) ou quimiluminescentes, sendo obrigatória a realização de ensaios de alta sensibilidade, os quais podem levar a resultados falso-positivos. Uma alternativa para ultrapassar este obstáculo baseia-se na utilização de proteínas recombinantes quiméricas, elevando a especificidade sem, contudo, reduzir a sensibilidade. Recentemente quatro proteínas quiméricas (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4) foram sintetizadas e avaliadas em estudos de fase I e II, sendo demonstrados elevados valores de desempenho e baixos índices de reatividade cruzada. **OBJETIVO:** Avaliar a utilização dos antígenos quiméricos IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 do *T. cruzi* para a triagem sorológica da DC em bancos de sangue. **MATERIAL E MÉTODOS:** Os antígenos foram expressos através da clonagem em vetor pET28a e expressão em *E. coli* BL21-Star. Um total de 5.014 foram obtidas de doadores da Fundação HEMOBA. As placas de ELISA foram sensibilizadas utilizando as moléculas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4, separadamente, como antígeno de captura. A análise de classe latente (LCA) foi utilizada para definição da condição sorológica para a DC das amostras inscritas no estudo. Trata-se de uma ferramenta estatística utilizada para avaliar ensaios diagnósticos para doenças que não possuem testes de referência. Em seguida, o potencial diagnóstico de cada molécula foi validado através de curvas ROC e o desempenho dos testes determinado através de tabelas de dupla entrada. **RESULTADOS:** Do total de amostras analisadas, a LCA classificou 4.993 (99,6%) amostras como negativas e 21 (0,4%) como positivas. Os valores da área abaixo da curva variaram de 99,3% a 100% para todas as moléculas IBMP. A acurácia variou de 99,9% a 100%. A sensibilidade foi de 85,7%, 90,4%, 95,2%, 99,9% para dos antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4, respectivamente, enquanto a especificidade foi de 100% para IBMP-8.1 e IBMP-8.2, 99,9% e 100% para as moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4. Do total de amostras positivas para a DC, seis apresentaram coinfeção para outras doenças infecto-parasitárias como: HTLV, sífilis, HCV e HBC. Não houve reatividade cruzada para nenhum dos quatro antígenos. **CONCLUSÃO:** O uso de antígenos quiméricos é uma alternativa para reduzir o número de bolsas descartadas indevidamente por apresentarem resultado falso-positivo, em virtude da elevada sensibilidade dos testes, reatividade cruzada bem como na redução dos custos para a realização da triagem sorológica das bolsas coletadas.

Palavras-chaves: Doença de Chagas, proteínas recombinantes quiméricas, imunodiagnóstico, banco de sangue, acurácia.

SANTOS, Emily Ferreira dos. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* chimeric antigens for the diagnosis of Chagas disease in blood banks. 112 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Chagas disease (CD) is among the top ten causes of inability to donate blood. Blood centers use tests to detect anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies using immunoenzymatic (ELISA) or chemiluminescent methods, and high sensitivity tests are mandatory, which can lead to false-positive results. An alternative to overcome this obstacle is based on the use of chimeric recombinant proteins, increasing specificity without, however, reducing sensitivity. Recently, four chimeric proteins (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 and IBMP-8.4) were synthesized and evaluated in phase I and II studies, with high performance values and low cross-reactivity rates. **AIM:** Evaluate the utilization of these IBMP chimeric antigens for CD diagnostic clarification in blood banks. **MATERIALS AND METHODS:** The antigens were expressed through cloning in vector pET28a and expressed in *E. coli* BL21-Star. A total of 5.014 were obtained from donors from the HEMOBA Foundation. The ELISA plates were sensitized using the molecules IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 and IBMP-8.4, separately, as the capture antigen. Latent class analysis (LCA) was used to define the serological condition for CD of the samples enrolled in the study. It is a statistical tool used to evaluate diagnostic tests for diseases that do not have reference tests. Then, the diagnostic potential of each molecule was validated through ROC curves and the performance of the tests determined through double entry tables. **RESULTS:** Of the total samples analyzed, the LCA classified 4,993 (99.6%) samples as negative and 21 (0.4%) as positive. The values of the area below the curve ranged from 99.3% to 100% for all IBMP molecules. Accuracy ranged from 99.9% to 100%. The sensitivity was 85.7%, 90.4%, 95.2%, 99.9% for the antigens IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 and IBMP-8.4, respectively, while the specificity was 100 % for IBMP-8.1 and IBMP-8.2, 99.9% and 100% for the IBMP-8.3 and IBMP-8.4 molecules. Of the total positive samples for CD, six presented co-infection for other infectious and parasitic diseases such as: HTLV, syphilis, HCV and HBC. There was no cross-reactivity for any of the four antigens. **CONCLUSION:** The use of chimeric antigens is an alternative to reduce the number of bags improperly discarded because they present false-positive results, due to the high sensitivity of the tests, cross-reactivity as well as the reduction of costs for carrying out the serological screening of the collected bags.

Keywords: Chagas disease, chimeric recombinant proteins, immunodiagnosics, blood bank, accuracy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas.....	9
Figura 2	Desenho esquemático das formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> e sua organelas.....	12
Figura 3	Refúgios dos triatomíneos em áreas rurais no estado da Paraíba.....	13
Figura 4	Principais espécies de triatomíneos que transmite a DC.....	14
Figura 5	Evolução do controle da DC no Brasil entre 1989 e 1999.....	15
Figura 6	Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	16
Figura 7	Evolução natural da DC em humanos.....	18
Figura 8	Locais de entrada do <i>T. cruzi</i>	19
Figura 9	Achados comuns da forma cardíaca da DC crônica.....	21
Figura 10	Manifestações gastrintestinais da DC crônica.....	23
Figura 11	Distribuição global de casos da DC crônica com base em estimativas oficiais, 2006-2010.....	24
Figura 12	Esfregaço sanguíneo para teste parasitológico direto com sangue a fresco.....	28
Quadro 1	Sensibilidade e especificada dos testes sorológicos empregados em bancos de sangue.....	29
Figura 13	Esquema do teste de ELISA.....	31
Figura 14	Representação esquemática da IFI positiva.....	33
Figura 15	Representação esquemática de uma reação de hemaglutinação indireta (HAI) positiva.....	34
Quadro 2	Composição dos antígenos recombinantes IBMP.....	38
Figura 16	Padrões de resposta de classe latente e probabilidade a posteriori dos antígenos IBMP para o diagnóstico preciso da DC crônica.....	39
Figura 17	Fluxograma para a testagem e liberação de bolsas de sangue na triagem sorológica para DC na Fundação HEMOBA.....	42

Quadro 3	Lotes de produção e concentração dos antígenos IBMP.....	46
Figura 18	Fluxograma para a obtenção e caracterização amostral.....	47
Figura 19	Combinação binária entre os prováveis resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.....	51
Quadro 4	Interpretação dos valores das razões de verossimilhança.....	54
Quadro 5	Interpretação dos valores de AUC.....	56
Figura 20	Análise de classe latente (LCA) utilizado para caracterização do perfil sorológico do painel amostral inscrito no estudo.....	57
Figura 21	SDS-PAGE dos antígenos IBMP corados pelo azul de Coomassie.....	59
Figura 22	Distribuição geográfica, segundo município e microrregião, dos doadores oriundos do estado da Bahia (n = 4.909)	60
Figura 23	Distribuição geográfica, segundo município, dos doadores oriundos de outros estados brasileiros (n = 79), exceto a Bahia.....	61
Figura 24	Perfil sorológico das amostras inscritas neste estudo (n = 5.014) coletadas no período de dezembro de 2018 a agosto de 2019. Triagem realizada no setor de sorologia da Fundação HEMOBA.....	62
Figura 25	Gráficos das curvas ROC e valores de AUC dos antígenos IBMP utilizando a análise de classe latente como teste de referência.....	66
Figura 26	Análise gráfica dos índices de reatividade dos antígenos IBMP na fase III do estudo.....	67
Figura 27	Análise gráfica dos valores das probabilidades pré e pós-teste através de nomogramas de Fagan.....	70
Figura 28	Análise gráfica da reatividade cruzada aos antígenos IBMP utilizando amostras não negativas triadas pela Fundação HEMOBA.....	72
Figura 29	Análise do uso dos antígenos IBMP na triagem sorológica para a DC crônica.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características sociodemográficas e índices de reatividade no teste de triagem dos doadores com resultado não negativo para a DC triados no HEMOBA entre dezembro de 2018 e agosto de 2019.....	63
Tabela 2	Classificação das amostras como positivas para a DC utilizando a análise de classe latente como teste de referência.....	65
Tabela 3	Parâmetros de desempenho dos antígenos IBMP estratificados na fase III do estudo.....	68
Tabela 4	Coinfecção entre DC e outras doenças infecciosas triadas no HEMOBA como não negativas.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acu	Acurácia
ALTA	Detecção de anticorpos anti-tripomastigota vivo por citometria de fluxo (<i>Flow cytometry detection of anti-live trypomastigote antibodies</i>)
AR	Argentina
AUC	Área abaixo da curva (<i>Area under curve</i>)
CO	Ponto de corte (<i>cut-off</i>)
CLIA	Quimiluminescência
DC	DC
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DO	Densidade óptica
DOR	<i>Odds Ratio</i> Diagnóstico
DP	Desvio padrão
DTU	Unidade de tipagem discreta (<i>Discrete Typing Unit</i>)
ELISA/EIA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked-Immunesorbent Assay</i>)
Esp	Especificidade
Exa	Exatidão
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FN	Falso-negativo
FP	Falso-positivo
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HAI	Hemaglutinação Indireta
HBV	Vírus da hepatite B (<i>Hepatitis B virus</i>)
HCV	Vírus da hepatite C (<i>Hepatitis C virus</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humanas (<i>Human T-cell lymphotropic virus</i>)
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
IC	Imunocromatografia
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IR	Índice de Reatividade
kDNA	DNA do cinetoplasto (<i>Kinetoplast DNA</i>)
n	Número amostral
NaCl	Cloreto de sódio
ND	Informação não disponível
NEG	Negativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
P0	Probabilidade observada
PBS	Tampão fosfato-salina
PBS-Tween	Tampão fosfato-Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
POS	Positivo
PPT	Probabilidade pré-teste
PPTN	Probabilidade pós-teste negativo
PPTP	Probabilidade pós-teste positivo
RIPA	Radioimunoprecipitação (<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>)
ROC	Característica de Operação do Receptor (<i>Receiver operating characteristic</i>)
RV+	Razão de verossimilhança positivo
RV-	Razão de verossimilhança negativo
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEN	Sensibilidade
TMB	Tetra-metil-benzidina
VN	Verdadeiro negativo
VP	Verdadeiro positivo
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
WB	<i>Western blot</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μg	Micrograma
μl	Microlitro
° C	Graus Celsius
kDa	Quilodalton
mg	Miligrama
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
κ	Kappa de Cohen
μm	Micrômetro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mA	Miliampère
σ	Desvio padrão
<	Menor que
>	Maior que
≥	Maior ou igual que
≤	Menor ou igual que
J	Índice de Younden

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	6
2	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1	HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	9
2.2	O PARASITO.....	10
2.3	VIAS DE TRANSMISSÃO.....	12
2.3.1	Transmissão vetorial	13
2.3.2	Transmissão transfusional	16
2.3.3	Transmissão congênita	17
2.4	ASPECTOS CLÍNICOS.....	17
2.4.1	Fase aguda	19
2.4.2	Fase crônica	20
2.4.2.1	Forma cardíaca.....	20
2.4.2.2	Forma digestiva.....	21
2.5	EPIDEMIOLOGIA.....	23
2.6	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	26
2.6.1	Diagnóstico parasitológico	27
2.6.2	Diagnóstico sorológico	28
2.6.2.1	ELISA (<i>enzyme linked-immunosorbent assay</i>).....	30
2.6.2.2	Imunofluorescência Indireta (IFI).....	32
2.6.2.3	Hemaglutinação Indireta (HAI).....	33
2.6.2.4	Quimioluminescência (CLIA).....	34
2.7	BANCO DE SANGUE.....	34
2.8	DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS.....	37
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL.....	44
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	45
4.1.1	Locais do estudo	45
4.1.2	Considerações éticas	45
4.2	OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....	45
4.2.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida	46
4.3	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	46
4.3.1	Dimensionamento amostral	46
4.3.2	Obtenção e caracterização do painel sorológico	47

4.3.4	Critérios de inclusão	47
4.3.5	Critérios de exclusão	48
4.4	ELISA INDIRETO.....	48
4.4.1	Sensibilização das microplacas	48
4.4.2	Obtenção do pool	48
4.4.3	ELISA indireto	49
4.5	EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS	49
4.5.1	Definição do <i>cut-off</i> (CO)	49
4.5.2	Normalização dos dados	50
4.5.3	Determinação dos parâmetros de desempenho	50
4.5.4	Testes estatísticos	56
4.5.5	Análise de classe latente	56
4.5.6	Mapas temáticos	57
5	RESULTADOS	58
5.1	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ANTÍGENOS	59
5.2	DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL	59
5.3	ANÁLISE DE CLASSE LATENTE (LCA)	64
5.4	PARÂMETROS DIAGNÓSTICOS COM ANTÍGENOS ISOLADOS.....	65
5.5	ANÁLISE DE COINFECÇÃO E REATIVIDADE CRUZADA.....	71
5.6	ANTÍGENOS IBMP NA TRIAGEM SOROLÓGICA.....	72
6	DISCUSSÃO	75
6.1	DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL.....	76
6.2	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	77
6.3	ANÁLISE DE CLASSE LATENTE (LCA).....	79
6.4	DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS IBMP.....	80
6.5	ANÁLISE DE COINFECÇÃO E REATIVIDADE CRUZADA	87
6.6	ANTÍGENOS IBMP E CLIA NA TRIAGEM SOROLÓGICA.....	88
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
8	PERSPECTIVAS	92
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE	111

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é uma zoonose provocada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). É endêmica em 21 países das Américas e consiste em um problema de Saúde Pública, especialmente na América Latina (OMS, 2015). Os vetores de maior importância epidemiológica são o *Triatoma infestans* (encontrado na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai e Peru), *Rhodnius prolixus* (encontrado na Colômbia, Venezuela e América Central), *Triatoma dimidiata* (mais comum no Equador e na América Central) e o *Rhodnius pallescens* no Panamá (OPAS, 2016).

Em regiões endêmicas, a principal via de transmissão do parasita ocorre através do vetor, que libera excrementos contaminados pelas formas metacíclicas do *T. cruzi* na pele ou mucosas. Apesar desta ser a principal rota de infecção, o controle e a redução do número de triatomíneos permitiram que a transmissão transfusional tivesse uma maior relevância epidemiológica. Similarmente, em áreas não endêmicas, dada a ausência do vetor, a transfusão sanguínea representa uma das principais vias de transmissão do parasita (CAMPOS, 2018; DIAS, 2009). Por este motivo, a triagem sorológica para a DC tornou-se obrigatória em diversos países. No Brasil, particularmente, a sua obrigatoriedade foi instituída em 1969 (BRASIL, 1970). Em 1998, 0,97% das bolsas de sangue coletadas foram rejeitadas por apresentarem reatividade ao *T. cruzi* (DIAS; SCHOFIELD, 1998). Nos anos de 1993 e 1994, o Hemocentro de São Paulo descartou 6.936 bolsas por serem reativas para o *T. cruzi* em pelo menos um dos três testes utilizados na triagem sorológica (SALLES *et al.*, 2003). Segundo Teixeira e Oliveira (2015), a prevalência da infecção em doadores de sangue chega a 0,6% em hemocentros públicos e 0,7% em privados (TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2015).

No ano de 2013, a ANVISA reportou inaptidão sorológica em aproximadamente 90 mil (0,34%) das 2.505.158 coletas realizadas no país devido à positividade para a DC (ANVISA, 2013). Por causa deste elevado número de bolsas positivas (e descartadas), os testes sorológicos utilizados para a triagem sorológica em bancos de sangue devem apresentar elevados valores de acurácia e baixos índices de reatividade cruzada. No entanto, o seu desempenho depende da fase da doença e dos antígenos usados para a detecção dos anticorpos anti-*T. cruzi* (SANTOS *et al.*, 2016a). Além disso, em virtude do elevado grau de polimorfismo genético inerente ao parasita, o desempenho dos testes pode variar de acordo com a região geográfica (ZINGALES, 2018). Por outro lado, a utilização de antígenos recombinantes eleva a especificidade com redução da sensibilidade. Muitos destes antígenos possuem epítomos repetitivos em sua sequência, os quais não são reconhecidos pela

integralidade de cepas circulantes. Por conta desta problemática, a Organização Mundial da Saúde (OMS) define que o diagnóstico da DC deve ser realizado por dois testes comerciais, em paralelo, e a concordância entre eles define a condição sorológica do indivíduo como positivo ou negativo (OMS, 2007). Assim, uma alternativa para ultrapassar este obstáculo baseia-se na utilização de proteínas recombinantes quiméricas, as quais são formadas por regiões conservadas e repetitivas de diversas proteínas do *T. cruzi* em uma única molécula (SANTOS *et al.*, 2016b). Esta estratégia possibilita manter os índices de desempenho elevados mesmo quando o teste é utilizado em regiões geográficas com circulação de diferentes linhagens genéticas do parasita (SANTOS *et al.*, 2017a; DOPICO *et al.*, 2019; DEL-REI *et al.*, 2019).

Um dos grandes desafios para os bancos de sangue consiste na redução do número de bolsas descartadas indevidamente por apresentarem resultados falso-positivos, bem como na redução dos custos para a realização da triagem sorológica. Apesar disto, o Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu que a triagem para a DC deve ser realizada por apenas um teste de alta sensibilidade (BRASIL, 2016), sendo eleitos para esta finalidade os métodos quimiluminescentes. Embora possua elevado custo, esta metodologia apresenta a vantagem de ser automatizada e analisar muitos indivíduos diariamente. No entanto, em virtude de sua elevada sensibilidade analítica, um quantitativo maior de resultados falso-positivos é reportado, levando a um desgaste emocional ao doador e descarte indevido das bolsas de sangue (MIGUEL *et al.*, 2017).

Recentemente, quatro proteínas recombinantes quiméricas foram obtidas por meio de técnicas de engenharia genética, as quais foram denominadas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 (SANTOS *et al.*, 2016). Estas proteínas foram avaliadas em estudos de fase I (SANTOS *et al.*, 2016b) e II utilizando os testes de ELISA (SANTOS *et al.*, 2017a), microarranjo líquido (SANTOS *et al.*, 2017b) e imunocromatografia (SILVA, 2016; SILVA *et al.*, 2020) como plataformas diagnósticas, sendo demonstrados elevados valores de acurácia e baixos índices de reatividade cruzada para diversas doenças infecto-parasitárias. Adicionalmente, o desempenho dos antígenos foi avaliado utilizando a análise de classe latente (LCA), ferramenta estatística cuja finalidade é avaliar novos testes na ausência do padrão-ouro (SANTOS *et al.*, 2018). Os autores observaram que a LCA corroborou com dados de desempenho obtidos anteriormente, quando dois testes comerciais foram empregados como padrão-ouro. Desta forma, a utilização de antígenos recombinantes quiméricos na triagem sorológica da DC em bancos de sangue, poderá levar a redução de descarte de bolsas por resultados falso-positivos. Neste estudo, o desempenho confirmatório

das moléculas IBMP foi realizado individualmente, considerando a LCA como padrão-ouro para o diagnóstico da DC.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS

A DC surgiu há cerca de 100 milhões de anos, iniciando-se com o ciclo silvestre e posteriormente o doméstico, o qual ocorreu a partir da interação do homem com os triatomíneos. Entre os séculos XIX e XX, a endemia foi consolidada, tendo forte relação com a crescente população rural e má qualidade de vida (DIAS, 2011). Contudo, o que marcou a presença da tripanossomíase nas Américas foi a descoberta feita pelo médico e cientista brasileiro Carlos Chagas (Figura 1), em 1909, com o registro da presença dos vetores invertebrados infectados com o parasita.

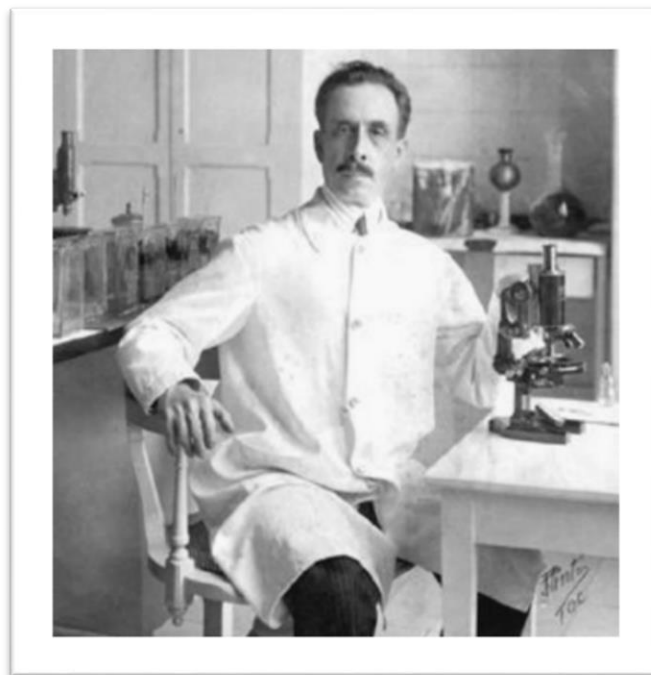


Figura 1: Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas.

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 DC.

Fonte: Steverding (2014).

A princípio, o seu objetivo era combater a malária que assolava os trabalhadores da construção da estrada de ferro Central do Brasil. Em 1908, utilizando um vagão de trem como moradia, laboratório e consultório, o cientista examinou pessoas e animais, o que levou a descoberta do *Trypanosoma minasense*, um parasita hemoflagelado encontrado no sangue de

um sagui (*Callithrix penicillata*) que foi transmitido por um inseto hematófago, da família *Triatominae*, popularmente conhecido como barbeiro, procoτό, chupança, chupão ou bicudo (DIAS, 2011; NEVES *et al*, 2005). Mais tarde, Carlos Chagas enviou a Manguinhos alguns barbeiros para serem alimentados em saguis. Um mês após o início da pesquisa, Chagas e Oswaldo Cruz perceberam que o protozoário encontrado nos animais não era o *T. minasense*, e sim uma nova espécie, sendo então batizada de *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz (KROPF, 2009; NEVES *et al*, 2005). Uma característica marcante do novo parasita era a sua capacidade de infectar cães, cobaias e coelhos e de ser cultivado em ágar-sangue (KROPF, 2009).

No ano seguinte, em 14 de abril de 1909, Carlos Chagas encontrou o parasito no sangue de uma criança, Berenice, uma menina de dois anos de idade. A Berenice foi notificada como o primeiro caso humano da DC. Após exame, foram encontrados inúmeros tripanosomas no sangue da menina com morfologia similar àqueles visualizados nos saguis infectados. A partir daí, Carlos Chagas descreveu, detalhadamente, a clínica da doença, fazendo uma ligação da fase aguda com alguns sintomas da fase crônica. Nos anos seguintes, Chagas também detectou o *T. cruzi* no sangue de tatus, encontrando o primeiro reservatório silvestre (CHAGAS, 1909).

2.2 O PARASITA

O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado pertencente ao super-reino Metakaryota, reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina e família Trypanosomatidae (CAVALIER-SMITH, 2009; DE CARLI, 2007). É caracterizado pela existência de um ou dois flagelos que emerge a partir de uma abertura conhecida como bolsa flagelar, contendo uma estrutura paraflagelar, localizada próxima ao cinetoplasto, organela onde encontra-se uma condensação de DNA, denominada de k-DNA, a mitocôndria é tubular apresentando cristas e DNA. Na forma epimastigota o cinetoplasto e a bolsa flagelar são anteriores ao núcleo. Na forma amastigota são organismos arredondados que apresentam flagelos inconspícuos (MASLOVL *et al.*, 2001).

O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes dentro da família Trypanosomatidae por incluir outras espécies causadoras de doenças nos seres humanos como, por exemplo, *Trypanosoma rodhesiense* e *Trypanosoma gambiense* causadores da doença do sono, e em animais, tais como o *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* e o *Trypanosoma*

equinum (BARRETT *et al.*, 2003; DE SOUZA, 2000; FERREIRA *et al.*, 2003). A primeira revisão taxonômica para a designação genérica foi realizada por Carlos Chagas em 1939, com a mudança de *Schizotrypanum cruzi* para *Trypanosoma cruzi*. Em 1966, Hoare & Wallace dividiram os tripanossomatídeos baseando-se no comportamento do parasita nos hospedeiros em duas seções, Stercoraria e Salivaria. A Stercoraria inclui o *T. cruzi*, o qual se desenvolve no tubo digestivo do vetor com liberação de formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas) nas fezes (CORLISS, 1994; DE SOUZA, 2000; PESSOA, MARTINS, 1988;). A seção Salivaria compreende os tripanosomas africanos transmitidos pela mosca tsé-tsé, sendo responsáveis pela doença do sono (STEVENS; GIBSON, 1999).

As formas evolutivas dos tripanossomatídeos são classificadas segundo o formato da célula e posição do núcleo, flagelo e cinetoplasto (Figura 2). Desta maneira, o *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas em seu ciclo de vida (BRENNER, 1997; VICKERMAN; PRESTON, 1976;). A tripomastigota (Figura 2A) é a forma infectante e não replicativa do parasita, encontra-se no hospedeiro vertebrado (sangue) e invertebrado (extremidade distal do tubo digestivo). O cinetoplasto possui um kDNA condensado e situa-se posteriormente ao núcleo, com o flagelo emergindo lateralmente da bolsa flagelar, localizada próximo ao cinetoplasto se estendendo junto ao corpo do parasito formando uma membrana ondulante (BRENNER, 1997). As formas amastigotas (Figura 2B) são estruturas intracelulares replicativas, sendo encontradas dentro das células dos hospedeiros mamíferos. São organismos arredondados sem flagelo livre ao microscópio óptico (HOARE; WALLACE, 1966). As epimastigotas (Figura 2C), são formas extracelulares replicativas encontradas no intestino médio dos triatomíneos e em cultivo axênico, onde se multiplicam por divisão binária. São alongadas, apresentam cinetoplasto e bolsa flagelar em posição anterior ou próxima ao núcleo e flagelo emergindo lateralmente (BRENNER, 1997).

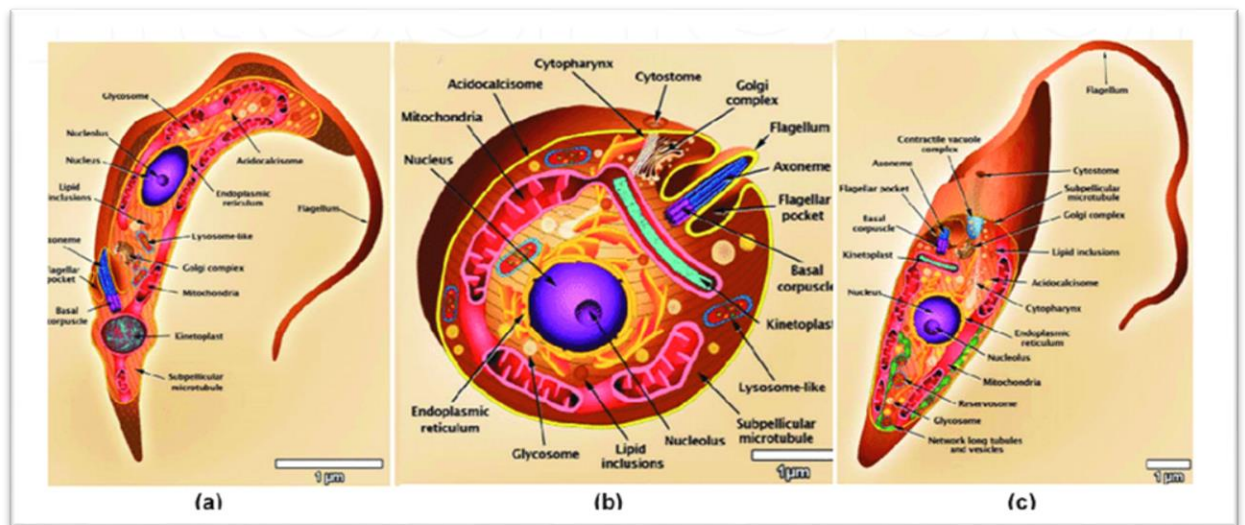


Figura 2: Desenho esquemático das formas evolutivas do *T. cruzi* e sua organelas.
Legenda: (A) Forma tripomastigota; (B) Forma amastigota; (C) Forma epimastigota.
Fonte: Modificada de Teixeira *et al.* (2012).

2.3 VIAS DE TRANSMISSÃO

Os principais mecanismos de transmissão da DC são a via vetorial, a mais importante em regiões rurais, responsável por 80% a 90% dos casos, a transfusional e por transplante de órgãos (OMS, 2002), a congênita (REICHE *et al.*, 1996), a amamentação (OMS, 2002) e a oral (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). Esta última recebeu maior notoriedade nos últimos anos (SANTOS *et al.*, 2020), sendo responsável por 68,9% dos casos agudos notificados no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), do Ministério da Saúde, entre os anos de 2000 a 2013 (BRASIL, 2015). A infecção por acidentes laboratoriais ou hospitalares pode ocorrer devido ao contato da pele ferida ou mucosas com material contaminado, porém são de menor proporção quando comparada a outras vias de transmissão (BRASIL, 2009). Recentemente foi sugerida a possibilidade de ocorrer infecção por relação sexual, entretanto há poucos relatos na literatura (ALMEIDA *et al.*, 2019; ARAUJO *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2019).

Mudanças no padrão epidemiológico de transmissão da DC no Brasil são resultantes das ações de controle empregadas desde 1950, com a campanha de profilaxia visando o controle químico dos vetores em 74 municípios, acompanhadas por mudanças ambientais, demográficas, econômicas e sociais (OMS, 2002; SCHOFIELD; DIAS, 1999). Deste modo, mecanismos como a transmissão transfusional, congênita e oral passaram a ter relevância e serem consideradas, juntamente com a transmissão vetorial, como principais modos de

transmissão de *T. cruzi* (MESSENGER; MILES; BERN, 2015; SILVEIRA, 2011; SILVEIRA; DIAS, 2011).

2.3.1 Transmissão vetorial

Também conhecida como mecanismo natural, a infecção pelo *T. cruzi* pode ser transmitida ao homem e outros mamíferos domésticos (cães, gatos, porcos, ratos) e silvestres (tatus, gambás, primatas) através do contato com as fezes contaminadas do inseto vetor. Trata-se de triatomíneos pertencentes a ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (DIAS, 1999), os quais são popularmente conhecidos como barbeiros, prococtós, chupanças, chupões ou bicudos pelo hábito de picarem a face de pessoas adormecidas (DIAS, 2011; NEVES *et al.*, 2005). São insetos de hábitos noturnos, hemimetabólicos, hematofagistas quase restritos, consomem qualquer tipo de sangue, são fotofóbicos, termotrópicos positivos, e na saliva há substâncias anticoagulantes e anestésicas (LAZZARI; PEREIRA; LORENZO, 2013; SCHOFIELD, 1979; TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2004). Os triatomíneos habitam locais como copas de palmeiras, tocas, troncos de árvores, fendas de casas (Figura 3) e outros refúgios (CLAYTON, 2010; MENDES, 2013). A destruição e a redução da fauna, juntamente com o aparecimento de habitações inadequadas, contribuíram para a domiciliação dos triatomíneos, pois nestes locais eles encontram abrigo e se alimentam dos animais domésticos e do ser humano, adaptando-se ao novo ambiente e estabelecendo o ciclo domiciliar e peridomiciliar independente do silvestre (BARRETO; RIBEIRO, 1979).



Figura 3: Refúgios dos triatomíneos em áreas rurais no estado da Paraíba.

Legenda: A: Casa pau-a-pique e taipa; B e C: Galinheiros no peridomicílio.

Fonte: MENDES *et al.* (2013).

Existe cerca de 129 espécies de triatomíneos. No Brasil, após o controle do *T. infestans*, o *Panstrongylus megistus* é considerado o principal e de maior importância epidemiológica (SILVA *et al.*, 2018). Além do Brasil, este inseto possui ampla distribuição na América do

Sul. Outros vetores também possuem grande relevância na transmissão vetorial do *T. cruzi* no Brasil (Figura 4), tais como o *T. brasiliensis* e o *T. pseudomaculata* (nordeste do Brasil) e o *T. sordida* (Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai) (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002; MARCILLA *et al.*, 2001; SCHOFIELD, 2000; SILVEIRA, 2011). Em países endêmicos da América Latina, os principais vetores são o *T. dimidiata* (México, América Central, Colômbia, Equador e Peru), o *Rhodnius prolixus* (partes da América Central, Venezuela e Colômbia), o *P. geniculatus*, *T. maculata* e *R. brethesi* (Amazônia brasileira) e o *T. phyllosoma* e o *T. protracta* (México). Só no Brasil são registradas 44 espécies, algumas são consideradas primárias (*T. infestans*, *T. rubrofasciata*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus megistus*) e outras de importância secundária (*Rhodnius neglectus*, *R. nasutus*, *Triatoma rubrovaria* e *T. vitticeps*) (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002; SILVEIRA; REZENDE, 1994)

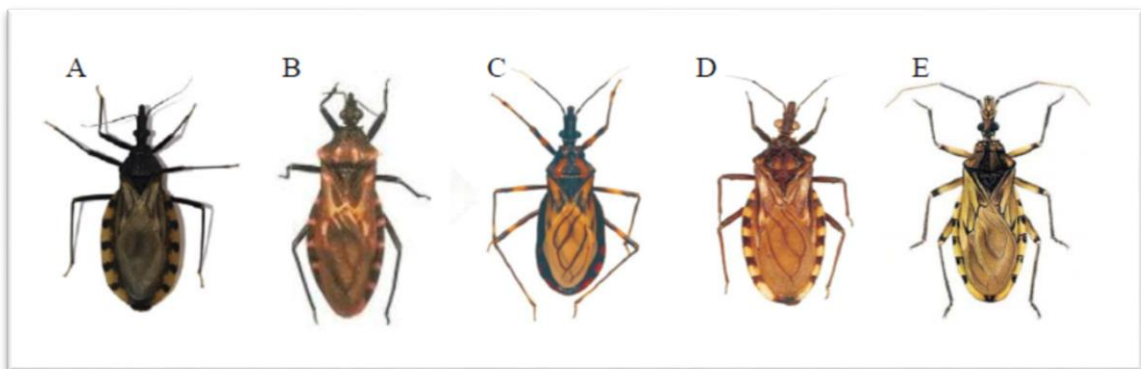


Figura 4: Principais espécies de triatomíneos que transmitem a DC.

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

Fonte: REPOLÊS, (2014).

A transmissão vetorial é o mecanismo primário e de maior importância para a disseminação da DC, chegando a representar 80% dos casos no Brasil (DIAS, 2000). Dos treze estados considerados endêmicos na década de 70, seis apresentavam focos de *T. infestans* até 1999. Entretanto, em 2003, apenas quatro ainda possuíam focos ativos (Figura 5). Esta redução deveu-se às ações sistemáticas e intensas de combate ao vetor iniciadas na década de 70. Tais ações tornaram-se mais intensas nos anos 80 em virtude de um acordo governamental dos países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) para a erradicação do *T. infestans*. Como consequência, o Brasil recebeu a Certificação da Interrupção da Transmissão da DC pelo *Triatoma infestans* em 2006 pela OPAS/OMS (DIAS,

2007; DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002; BRASIL, 2014a; OPAS, 2006; SILVEIRA, 2011).

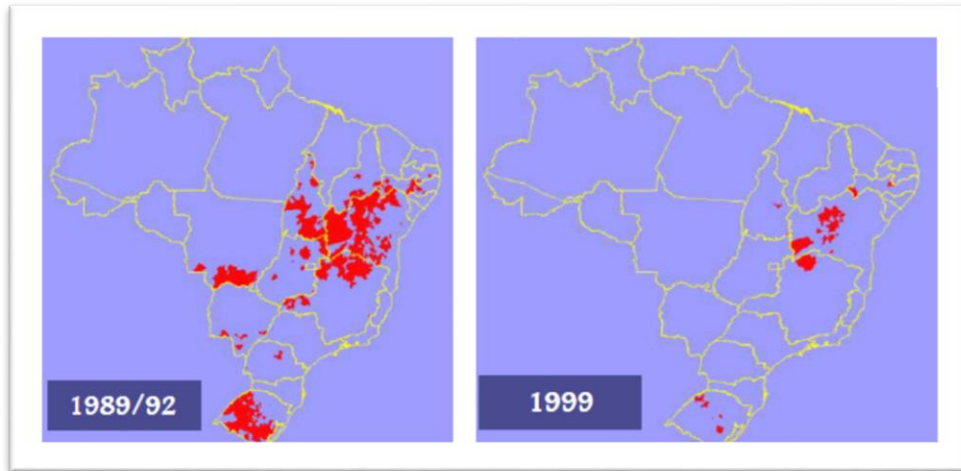


Figura 5: Evolução do controle da DC no Brasil entre 1989 e 1999.

Nota: Áreas em vermelho representa focos ativos de transmissão do *T. cruzi* pelo *T. infestans*

Fonte: MS/Secretaria de Vigilância Sanitária, 2006.

Para ocorrer a transmissão vetorial é necessário que o triatomíneo esteja infectado pelo parasita (Figura 6). Durante o repasto sanguíneo, formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas juntamente com fezes e/ou urina no local da picada, mucosa ou outra solução de continuidade. Após infecção do hospedeiro, as tripomastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) e sofrem diferenciação para amastigotas intracelulares. Estas últimas multiplicam-se intensamente por divisão binária simples e se diferenciam em tripomastigotas. As células repletas de tripomastigotas se rompem liberando o parasita na circulação sanguínea. Desta forma, novas células são infectadas dando continuidade ao ciclo. Quando circulantes no sangue periférico, as formas tripomastigotas poderão ser ingeridas por novos insetos vetores dando início a um novo ciclo (LIDANI *et al.*, 2017).

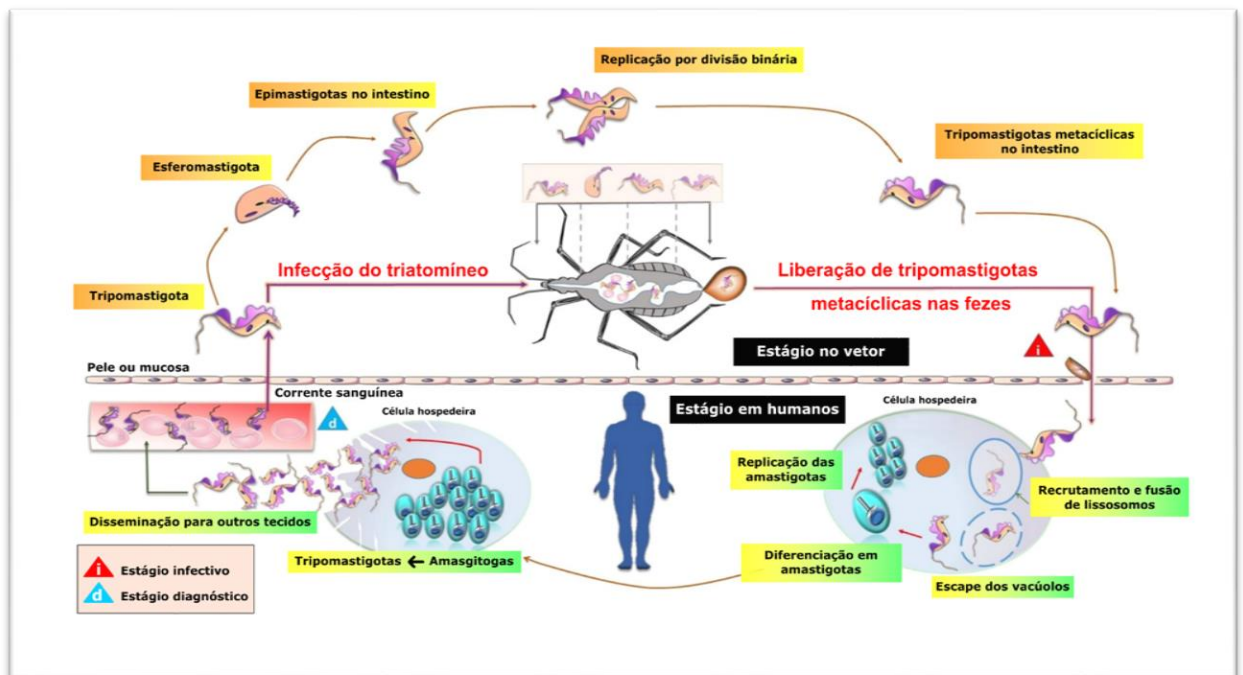


Figura 6: Ciclo de vida do *T. cruzi*.

Nota: A transmissão é iniciada por insetos vetores que defecam após um repasto sanguíneo, liberando tripomastigotas metacíclicas próximo ao local da picada. Este estágio é caracterizado pela invasão de células hospedeiras por tripomastigotas formando o vacúolo parasitóforo, do qual eles subsequentemente escapam, se diferenciam em amastigotas e se replicam no citosol. As amastigotas se dividem, diferenciam-se em tripomastigotas e, após a ruptura da célula, disseminam a infecção para os tecidos. As tripomastigotas atingem a corrente sanguínea, onde são eventualmente absorvidas pelo inseto vetor ou infectam novas células. Nos triatomíneos, as tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e migram para o intestino do inseto. Após intensa replicação, transformam-se em tripomastigotas metacíclicas, completando o ciclo de vida do parasita.

Fonte: Modificado de LIDANI *et al.*, 2017.

2.3.2 Transmissão transfusional

A transmissão por esta via é a segunda de maior relevância epidemiológica. Um dos fatores que contribuiu para o aumento do número de casos por transmissão transfusional foi a “urbanização da doença”, visto que a DC era predominantemente rural e se urbanizou em virtude do êxodo rural ocorrido no Brasil entre as décadas de 1960 e 1980 (SOUZA; RAMIREZ; BORDIN, 1997; DIAS, 1998; BRASIL, 2009). Outro fator para a elevação do número de casos por esta via baseia-se no aumento do fluxo migratório de indivíduos infectados de áreas endêmicas para países indenes, tais como os Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão e diversos outros da Europa, em especial a Espanha (SCHMUNIS, 1991; GUERRI-GUTTENBERG *et al.*, 2008). Como a DC não era endêmica nestas localidades, não havia regulamentação da triagem sorológica em bancos de sangue e conseqüentemente muitos indivíduos adquiriram a infecção ao receberem sangue ou derivados contendo formas

tripomastigotas. Por este motivo, a transmissão transfusional é considerada a mais importante em países não endêmicos.

O risco de um indivíduo se infectar através de hemoderivados contaminados é variável. Em regiões com alto índice de transmissão vetorial, como a Bolívia, a probabilidade chega a 49%. Entretanto, em países com baixos índices de infecção vetorial, como Brasil, Argentina, Uruguai e Chile, o risco varia entre 12% a 18% (BLOOD PRODUCTS ADVISORY COMMITTEE *et al.*, 2002; LEIBY, D. A. *et al.*, 1999).

2.3.3 Transmissão congênita

Assim como a transmissão transfusional, a congênita consiste em um sério problema de saúde pública tanto em áreas endêmicas quanto não-endêmicas (SCHENONE *et al.*, 1987). Esta forma de transmissão já foi bem documentada por diversos autores e recebeu maior notoriedade após a redução do número de casos pelas transmissões vetorial e transfusional (AZOGUE; FUENTE; DARRAS, 1985; BITTENCOURT, 1975; BITTENCOURT, 1992). O seu risco pode variar de 1,1 a 18,5%, dependendo da região, metodologia empregada, parasitemia materna, existência de lesões placentárias e da cepa infectante (AZOGUE, DARRAS, 1992; AZOGUE, FUENTE, DARRAS, 1995; NISIDA, AMANTO-NETO, 1998).

Nesta via, o mecanismo de transmissão é transplacentário e sua ocorrência é facilitada quando há ninhos de amastigotas na placenta, os quais liberam as tripomastigotas que atravessam o epitélio trofoblástico e atingem a circulação fetal através do estroma das vilosidades (BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000; NEVES, 2002). O diagnóstico é confirmado pela presença do *T. cruzi* na placenta ou no recém-nascido, ou através da pesquisa de anticorpos IgM no soro do recém-nascido pelos métodos sorológicos (NEVES, 2002; UMEZAWA *et al.*, 1996). A persistência de anticorpos da classe G (IgG) por mais de 6 a 9 meses em filhos de mães portadoras da DC é indicativa de infecção congênita (NISIDA, AMANTO NETO, 1998; CARLIER *et al.*, 2015)

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS

De acordo com seus aspectos clínicos, a doença apresenta dois estágios: a fase aguda e a crônica. A primeira delas é de curta duração, até 3 meses, ocorre logo após a infecção. Já a segunda é persistente, caracterizada por baixa parasitemia e insidiosa, desenvolvendo-se ao longo dos anos. Nesta fase, os infectados podem permanecer assintomáticos, sendo este

período denominado fase crônica indeterminada. Entretanto, 30% a 40% dos infectados evoluem para a forma sintomática, destacando-se as formas cardíaca, digestiva ou mista (cardiodigestiva) (MARIN-NETO *et al.*, 2002; RIBEIRO; ROCHA, 1998). As manifestações clínicas relacionadas a estas formas clínicas são consequentes de mecanismos multifatoriais referentes tanto ao parasito (variabilidade das cepas, o tropismo e antigenicidade) quanto ao hospedeiro (faixa etária, estado nutricional e estado imunológico (ANDRADE, 2000; DIAS, 1999). Todavia, inexistente um consenso sobre as causas definitivas que levam o indivíduo a desenvolver alguma forma clínica, ou permanecer assintomático. A figura 7 representa a evolução natural da doença.

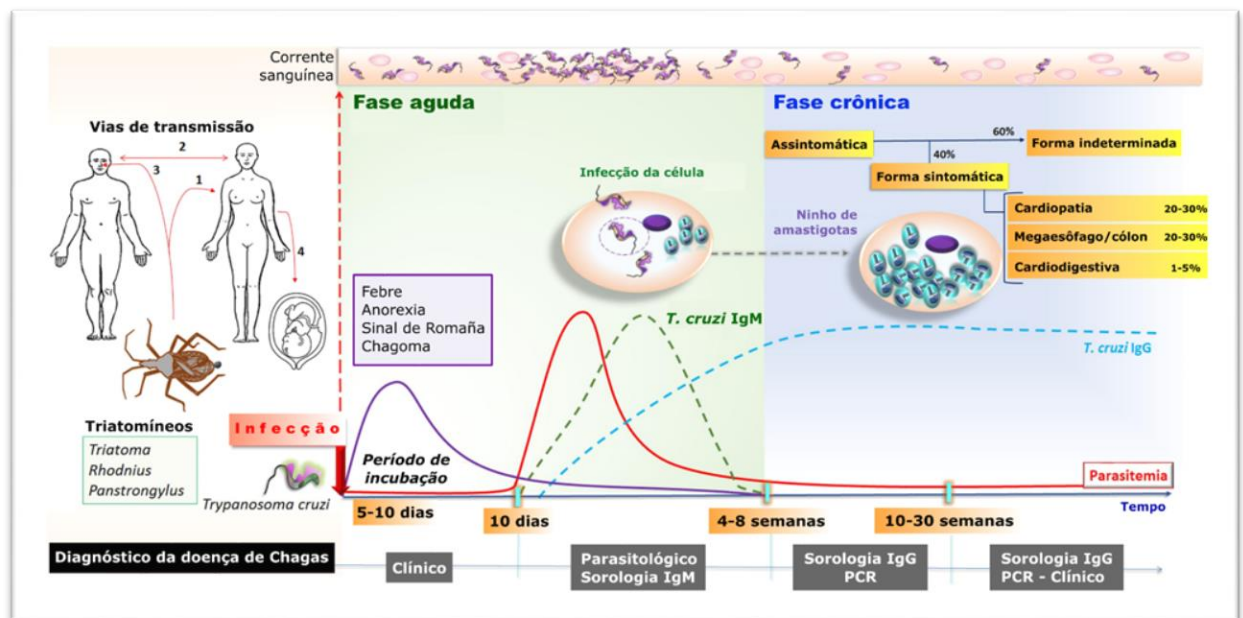


Figura 7: Evolução natural da DC em humanos.

Nota: A transmissão do *T. cruzi* pode ocorrer por (1) transfusão sanguínea vetorial (2) ou transplante de órgãos, (3) vias orais ou (4) congênitas. O período de incubação dura de 5 a 10 dias pós-infecção, o qual é seguido pela fase aguda com duração de 4 a 12 semanas. Esta fase é caracterizada por tripomastigotas circulantes, que podem ser visualizados no sangue e IgM anti-*T. cruzi*. Os anticorpos anti-*T. cruzi* podem ser detectados após 10 dias de infecção. A maioria dos indivíduos apresenta sintomas inespecíficos, como febre e anorexia, ou é assintomática, podendo desenvolver inflamação e inchaço no local de inoculação na pele ou conjuntiva, caracterizando o chagoma de inoculação e o sinal de Romaña, respectivamente. A fase crônica começa quando a parasitemia cai abaixo dos níveis detectáveis pela microscopia, geralmente 4 a 8 semanas pós-infecção. Desta forma, o diagnóstico é baseado na detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* ou através de testes moleculares. Nesta fase, a maioria dos infectados adentra uma forma assintomática prolongada, conhecida como forma indeterminada, e nunca desenvolverá sintomas relacionados à DC. No entanto, 10 a 30 anos após a infecção, 30 a 40% das pessoas desenvolvem manifestações clínicas, podendo ser relacionadas a queixas cardíacas, digestivas ou cardiodigestivas.

Fonte: Modificado de LIDANI *et al.*, 2017.

2.4.1 Fase Aguda

Esta fase é caracterizada por ser de curta duração, variando de um a três meses (Figura 7). Na maioria dos casos, os indivíduos são assintomáticos. Entretanto, quando sintomática, as manifestações são inespecíficas como mal-estar geral, linfadenopatia, edema localizado ou generalizado e febre. Tais manifestações ocorrem nos primeiros dias ou meses após a infecção e duram de quatro a doze semanas (BARRET, 2003; COURA, 2003).

Quando o local de entrada do parasita é a mucosa ocular, pode ocorrer um edema bpalpebral e unilateral, denominado sinal de Romaña (Figura 8A) (MUÑOZ-SARAVIA *et al.*, 2012). Quando a entrada ocorre em outros sítios da superfície corporal, a lesão inflamatória na pele recebe o nome de chagoma de inoculação (Figura 8B) (SANGENIS *et al.*, 2015). Manifestações sistêmicas como alterações nervosas, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e erupção cutânea podem estar presentes, assim como febre prolongada, dor de cabeça, dor muscular e palidez. Apesar da infecção aguda passar despercebida na maioria dos infectados, em 5-10% dos casos pode evoluir para o óbito causado por quadros meníngeos graves (meningoencefalite), insuficiência cardíaca, miocardite e efusão pericardial, isto dependerá do estado imunológico do hospedeiro (DIAS *et al.*, 2000; BERN *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2013; SCHOFIELD; JANIN; SALVATELLA, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Durante a fase aguda, o parasita pode ser facilmente detectado no sangue periférico (OMS, 2002; BARRETT *et al.*, 2003). Seu término ocorre quando o sistema imunológico reduz o número de parasitas circulantes tornando o diagnóstico parasitológico negativo.

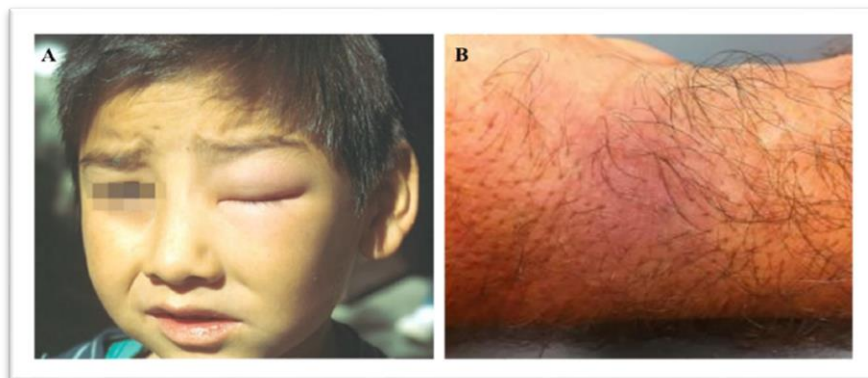


Figura 8: Locais de entrada do *Trypanosoma cruzi*.

Legenda: (A) Sinal de Romaña (unilateral e bpalpebral). (B) Chagoma de inoculação em punho esquerdo.

Fonte: MUÑOZ-SARAVIA *et al.*, 2012; SANGENIS *et al.*, 2015.

2.4.2 Fase Crônica

A transição para a fase crônica ocorre 2 a 12 meses após a infecção, com redução da parasitemia até níveis indetectáveis e detecção de imunoglobulinas da classe G, por meio de testes sorológicos (RIBEIRO; ROCHA, 1998; MARIN-NETO *et al.*, 2002). Esta nova condição é conhecida como forma crônica indeterminada (Figura 7), caracterizada pela ausência de alterações no eletrocardiograma e estudo radiológico de coração, esôfago e cólon, podendo durar de 10 a 30 anos. Os indivíduos nesta condição apresentam bom prognóstico e possuem expectativa de vida similar àquela observada para os não infectados (DIAS, 1989; MARIN-NETO *et al.*, 2002; GASCÓN, 2007; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

Contudo, 30 a 40% dos portadores desenvolvem manifestações clínicas relacionadas com o envolvimento patológico de órgãos específicos, notavelmente esôfago, coração e cólon. Presume-se que a progressão para o estágio crônico sintomático dependerá do estado imunológico e da cepa do *T. cruzi*. A depender do órgão acometido pode-se agrupar a forma clínica sintomática em digestiva, cardíaca e cardiodigestiva ou mista (DULTRA *et al.*, 2009; SABINO *et al.*, 2010; RASSI *et al.*, 2012; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

Recentemente, O Ministério da Saúde incluiu a DC aguda e crônica na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, através da Portaria N° 264, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2020. Para a DC aguda a notificação é imediata (até 24h) para Secretaria Estadual de Saúde ou Secretaria Municipal de Saúde. Já para a DC crônica, a notificação é semanal (BRASIL, 2020).

2.4.2.1 Forma cardíaca

A forma cardíaca é a manifestação mais grave e frequente da doença crônica. Geralmente acomete 20% dos portadores e tipicamente leva a anormalidades do sistema de condução, arritmias, aneurisma apical, insuficiência cardíaca, tromboembolismo e morte súbita. No eletrocardiograma (ECG), o bloqueio do ramo direito, o bloqueio fascicular anterior esquerdo (BFAE), batimentos ventriculares anormais, alterações ST-T, ondas Q anormais e baixa voltagem dos QRS são as anormalidades mais comumente relatadas. A combinação do bloqueio de ramo direito e do bloqueio fascicular anterior esquerdo é muito típica na cardiopatia chagásica. Batimentos ventriculares anormais, incluindo episódios de taquicardia, são achados frequentes no Holter e no teste de esforço (RASSI *et al.*, 2012).

A insuficiência cardíaca consiste na manifestação tardia mais frequente da cardiopatia chagásica, a qual é biventricular com predomínio de insuficiência do lado direito, com edema periférico, congestão hepática e ascite. A insuficiência cardíaca de etiologia chagásica está associada a maior mortalidade do que a insuficiência cardíaca por outras causas (FREITAS *et al.*, 2005). Embolias sistêmicas e pulmonares decorrentes de trombos no coração são achados comuns (MONTANARO *et al.*, 2019). A morte súbita cardíaca é responsável por quase dois terços de todas as mortes na cardiopatia chagásica, seguidas por insuficiência cardíaca refratária (25% a 30%) e tromboembolismo (10% a 15%) (RASSI; RASSI; RASSI, 2001).

A morte súbita pode ocorrer mesmo em indivíduos previamente assintomáticos, e geralmente está associada a taquicardia e fibrilação ventricular ou, mais raramente, com bloqueio atrioventricular total ou disfunção sinusal. Na doença cardíaca avançada os portadores desenvolvem quadros com aumento do coração, os quais são denominados de cardiomegalia. A figura 9 resume os achados comuns associados à cardiopatia chagásica crônica.

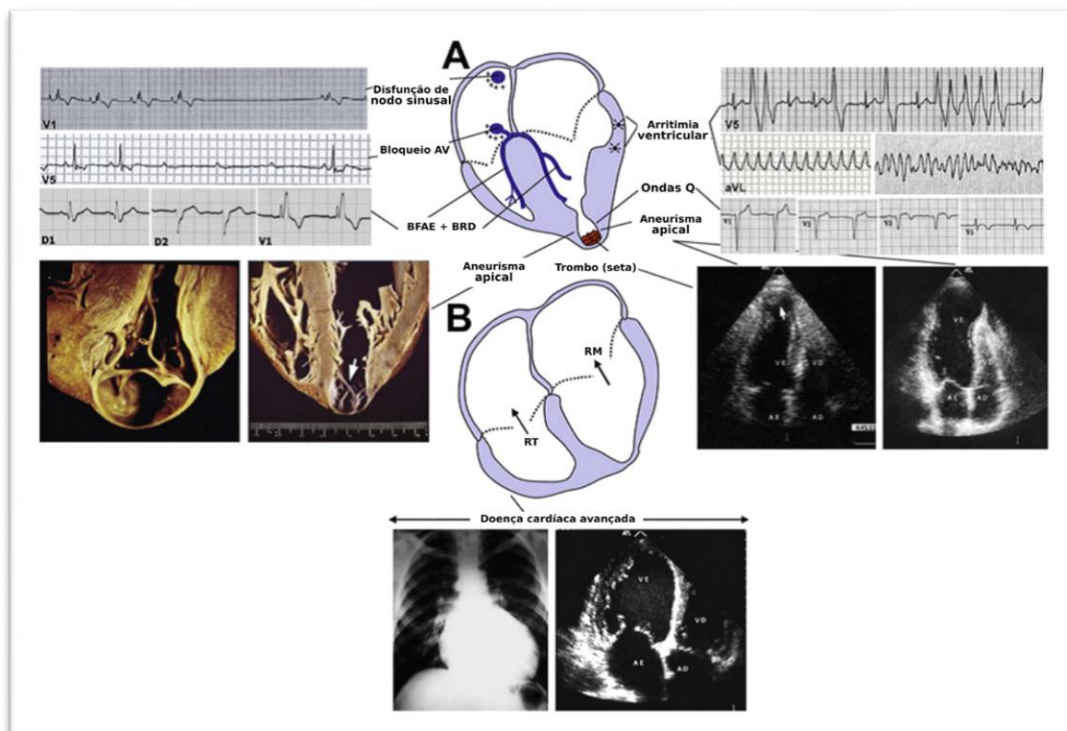


Figura 9: Achados comuns da forma cardíaca da DC crônica.

Legenda: (A) Forma segmentar cardíaca. (B) Forma cardíaca dilatada.

Fonte: RASSI; RASSI; MARCONDES, 2012.

2.4.2.2 Forma digestiva

A forma digestiva é caracterizada por alterações nas funções motoras, secretoras e absorptivas do esôfago e do trato gastrointestinal. As lesões do sistema nervoso entérico são fundamentais na patogênese das megasíndromes digestivas. A estrutura mais frequentemente afetada é o plexo mioentérico de Auerbach, localizado entre as camadas musculares longitudinal e circular do trato digestivo. Embora a maioria dos danos aos neurônios deste plexo e das fibras nervosas ocorra durante a infecção aguda, perda neuronal adicional ocorre lentamente durante toda a fase crônica. A denervação ocorre em graus variáveis, sendo irregular e não contínua. O esôfago e o cólon distal, devido à sua fisiologia, são os segmentos mais afetados. A denervação leva à perda da coordenação motora e acústica dos esfíncteres, evitando que esses segmentos esvaziem o material semissólido, causando dilatação; este é o mecanismo fisiopatológico subjacente ao megaesôfago e ao megacólon. O megaesôfago causa disfagia, regurgitação e dor esofágica. Outros sintomas menos frequentes consistem em soluços, pirose e hipersalivação acompanhada de hipertrofia parotídea (RASSI *et al.*, 2012).

A maioria dos casos de megacólon está associada aos de megaesôfago. Os sintomas mais comuns são constipação, meteorismo, distúrbio da atividade motora (discinesia) e, menos frequentemente, cólica abdominal. A constipação pode ocorrer em 25-30% dos indivíduos que apresentam dilatação radiológica do cólon. Ao exame físico, observa-se aumento do volume abdominal. Como o cólon distal é o segmento mais acometido, o sigmoide distendido ocupa grande parte da cavidade abdominal e pode ser localizado por palpação e percussão fora da sua topografia normal. A retenção prolongada de fezes no cólon distal leva à formação de fecaloma, que pode ser diagnosticado por simples palpação abdominal como um tumor elástico que pode ser moldado por pressão. O exame retal detecta um fecaloma na ampola retal. Outros segmentos e órgãos do aparelho digestivo podem estar comprometidos, causando alterações funcionais e morfológicas que podem ser detectadas por diferentes métodos investigativos, mas com prevalência e impacto muito menor que as lesões envolvendo esôfago e cólon (RASSI *et al.*, 2010).

Aproximadamente 20% dos indivíduos com megaesôfago apresentam envolvimento gástrico. As principais mudanças consistem no rápido esvaziamento gástrico para líquidos e o retardo no esvaziamento para sólidos, relaxamento adaptativo reduzido do estômago em resposta à distensão, ritmo elétrico gástrico alterado, gastrite crônica e hipertrofia do músculo pilórico (piloro-oclusão). No exame radiológico, o volume gástrico é extremamente variável,

e os indivíduos com megaesôfago avançado geralmente não têm ar no estômago (RASSI *et al.*, 2010).

O duodeno, após o esôfago e o cólon, é o segmento mais afetado. O megaduodeno está quase sempre associado a outras visceromegalias. A dilatação pode ser localizada, apenas no bulbo (megabulbo) ou no segundo e terceiro segmentos, ou ainda pode afetar toda a arcada duodenal. Mesmo quando não há dilatação, a discinesia e a hiper-reatividade aos estímulos colinérgicos são comuns devido à denervação entérica. Os sintomas causados pelo megaduodeno podem ser confundidos com dispepsia de origem gástrica, do tipo dismotilidade (RASSI *et al.*, 2010). As manifestações gastrintestinais da DC crônica são mostradas na figura 10.

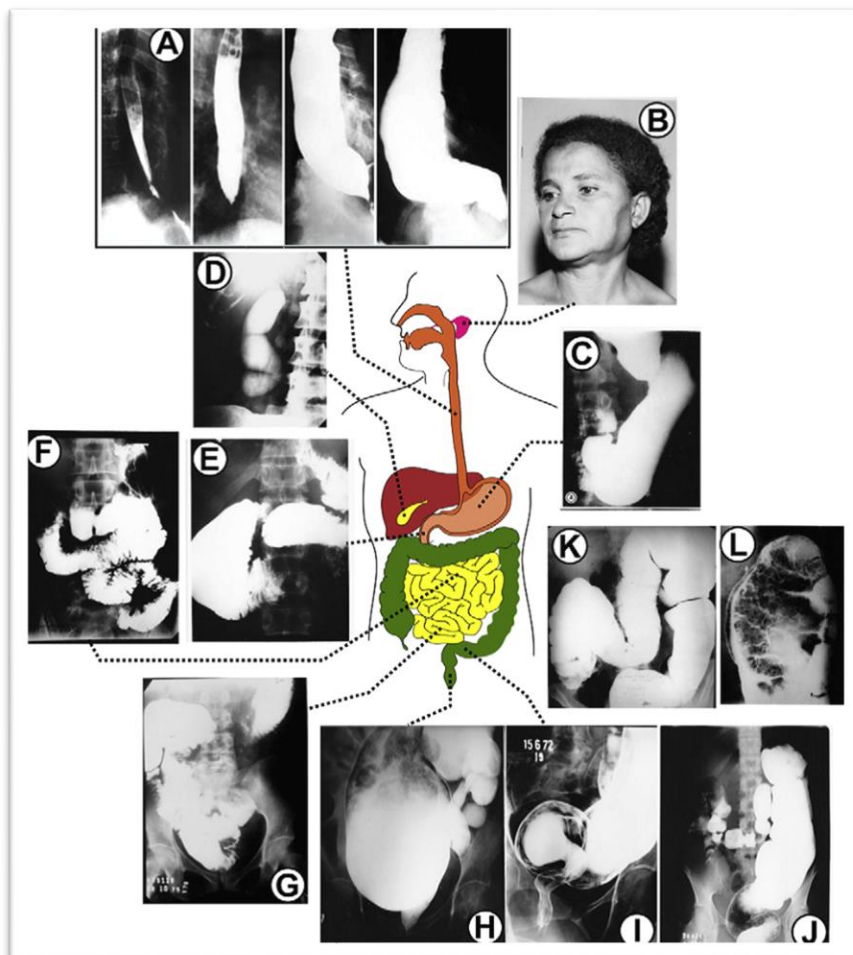


Figura 10: Manifestações gastrintestinais da crônica. DC

Legenda: (A) Megaesôfago (grupos I, II, III e IV). (B) Hipertrofia da parótida em indivíduo com megaesôfago. (C) Megaestômago associado com megaesôfago grupo IV. (D) Colecistomegalia. (E) Megaduodeno. (F) Megajejuno. (G) Megaíleo. (H) Megareto. (I) Megasigmóide. (J) Megaretosigmóide. (K) Megacólon total. (L) Fecaloma. (C), (D), (E), (F) e (G) consistem em manifestações raras.

Fonte: RASSI; RASSI; MARCONDES, 2012.

2.5 EPIDEMIOLOGIA

O perfil epidemiológico da DC mudou nas últimas décadas, pois era uma doença negligenciada que afetava, principalmente, os mais pobres e de ambiente rural. Em virtude do aumento do fluxo migratório de indivíduos de áreas endêmicas para países indenes, a DC tornou-se um problema de saúde pública mundial. Estimativas da OMS indicam que 6 a 7 milhões de indivíduos sejam portadores do *T. cruzi* (Figura 11), sendo que 30% a 40% desenvolverão a forma sintomática da DC (OMS, 2015). Na América Latina, 21 países são considerados endêmicos, 65 milhões de indivíduos correm o risco de contrair a infecção e 12 mil novos casos são estimados a cada ano (OMS, 2019; OPAS, 2006). Segundo a OPAS (2016), os programas de combate aos insetos vetores, ocorridos nos países endêmicos da América Latina, reduziram significativamente o número de indivíduos infectados. De fato, houve uma redução de 30 milhões em 1990 para 6-7 milhões em 2010. Redução semelhante foi observada para a incidência anual de 700 mil novos casos em 1990 para 28 mil em 2010 e 12 mil em 2019. Apesar desta redução, a DC continua representando um sério problema de saúde pública, dada a sua expressiva morbimortalidade (OPAS, 2016; BRASIL, 2019a).

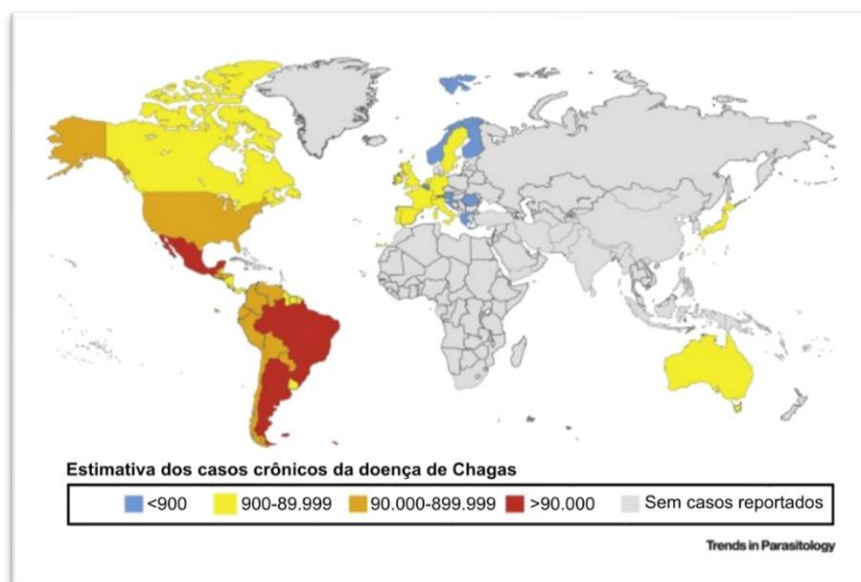


Figura 11: Distribuição global de casos da DC crônica com base em estimativas oficiais, 2006-2010.

Fonte: PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015 (tradução nossa).

A emigração da população rural para as zonas urbanas também teve um papel relevante na distribuição da doença. Estima-se que, nos anos 1990, 60% dos 16 a 18 milhões de portadores migraram para os grandes centros urbanos em busca de melhores condições de vida. Apesar

da redução do risco de transmissão vetorial, a probabilidade de infecção através de outras vias aumentou, como a transfusão de hemoderivados e a transmissão vertical (SCHMUNIS, 1991; MONCAYO, 1992). No Brasil, o fluxo populacional, aliado ao crescente número de transfusões sanguíneas a partir dos anos 1940, foi responsável por 20 mil novos casos da doença na década de 1970 (FITARELLI; HORN, 2009; WESTPHALEN, 2012). Neste mesmo período, um inquérito epidemiológico revelou prevalência de 4,28% da DC na população brasileira e estimou que 6,5 milhões de indivíduos estavam sob risco de contrair a infecção (SCHMUNIS, 1991; SILVEIRA; VINHAES, 1999). Ainda neste período, um inquérito entomológico definiu que 36% do território nacional consistia em área endêmica para a DC, com triatomíneos localizados no intradomicílio de 2.493 municípios distribuídos em 18 estados brasileiros (SILVEIRA, VINHAES, 1999; SILVEIRA, REZENDE, 1994).

No Brasil, as ações de controle da transmissão vetorial e transfusional, desenvolvidas em 1975 e 1991, respectivamente, levaram a redução significativa da incidência da doença. Desde a comprovação da transmissão transfusional, o número de indivíduos infectados caiu de 16 para 7,6 milhões, e a soroprevalência de 8,3% em 1970 para 6,9% entre 1989 e 1990. Dados mais atuais mostram uma prevalência de 0,1-0,2% para a população brasileira (SCHMUNIS, CRUZ, 2005; OPAS, 2006; OSTERMAYER, 2008). Estudos realizados em vários estados do Brasil corroboram com estes dados. Em Pernambuco, na década de 70, a soroprevalência de doadores era de 4,4%, 30 anos depois um estudo realizado na Fundação HEMOPE encontrou uma prevalência de 0,17% (MELO *et al.*, 2009). No Rio Grande do Sul, em 1979, a soroprevalência era de 3,3% (BARUFFA, 1979) e em 2008 foi de 0,5% (ARAÚJO, VIANNA, BERNE, 2008). Em São Paulo, na década de 80, foi encontrada uma prevalência de 2,9% (SCHMUNIS, 1991), no entanto, em 2003, este valor diminuiu para 0,2% (SALLES *et al.*, 2003). Dois estudos foram realizados no Hemocentro Regional de Uberaba, o primeiro foi realizado na década de 60 e mostrou que 16,6% de doadores eram portadores da DC (MORAES-SOUZA, 1985). No segundo, em 2005, apenas 0,3 % foram positivos para DC (MORAES-SOUZZA, 2006). Na Bahia, através de um estudo de corte transversal realizado entre os anos de 2008 e 2018, foram identificadas 3.084 amostras não negativas para o *T. cruzi* em 415 municípios do estado, demonstrando uma prevalência de 0,62% (MIRANDA *et al.*, 2019).

No contexto dos países não endêmicos, vários grupos se dedicam a avaliar a prevalência da DC em doadores de sangue. De fato, um estudo conduzido por Kerndt *et al.* (1991) avaliou doadores de 11 hemocentros dos Estados Unidos. Entre os 988 doadores inscritos no estudo, houve uma prevalência de 1,1% e relato de dois casos de DC transfusional (GEISELER *et al.*,

1987; GRANT, 1989). Dados recentes estimam que aproximadamente 7,5% dos 300 mil portadores da DC, residentes nos EUA, tenham adquirido a infecção em 14 hemocentros distribuídos em diferentes locais do país, em especial Califórnia, Flórida e Texas (SANCHES, 2018).

Diversos registros de doadores positivos para a DC já foram realizados em vários países do mundo, como no Canadá (NICKERSON *et al.* 1989; KICKOFF, 1989; FEARON, 2013), Espanha (VILALBA *et al.*, 1992; PELLEGRINO, 2004; FLORES-CHÁVEZ *et al.*, 2008; MUÑOZ *et al.*, 2009), Austrália (AUSTRALIAN BUREAU OF STATISTICS, 2006) e Japão (NISHIMURA *et al.*, 1997; UENO *et al.*, 1995; IMMIGRATION BUREAU, 2006; SAYAMA *et al.*, 2019). Atualmente, quatro países europeus aplicam medidas de prevenção para a transmissão do *T. cruzi* através de transfusão: Espanha, França, Reino Unido e Suíça. Desde o ano de 2006 existe política para triagem de doadores de sangue e órgãos sob risco para a infecção considerando o seu histórico epidemiológico (Comissão das Comunidades Europeias, 2006; FERRÃO *et al.*, 2013). Devido a este quadro os gastos globais para a DC atinge cerca de US\$ 8 bilhões por ano (LEE *et al.*, 2013).

No Brasil, predominam os casos crônicos decorrentes da infecção por via vetorial em décadas passadas (BRASIL, 2015). Este fato é decorrente do sucesso das ações de controle na eliminação do *T. infestans*, bem como a redução da infestação e densidade intradomiciliar das demais espécies capazes de transmitir o parasita. Em áreas endêmicas, os índices de transmissão vetorial diminuíram em mais de 95% (SCHMUNIS, 1997; DIAS, 2007). Contudo, ainda não foi alcançado o controle efetivo da doença, uma vez que 4 milhões de brasileiros estão cronicamente infectados pelo *T. cruzi* (BRASIL, 2019a). Apesar do progressivo declínio da incidência geral entre os candidatos a doação, estima-se em 55 mil o número de doadores com sorologia positiva para *T. cruzi*, e uma ocorrência anual em torno de 0,6% (AMANTO, 1993; MORAES-SOUZA *et al.*, 2006). De um modo geral, as ações de controle adotadas no Brasil apresentaram resultados efetivos para a diminuição da prevalência e incidência da doença, todavia estas medidas devem ser de caráter contínuo para detectar e controlar surtos esporádicos, como tem ocorrido no estado do Pará (JÚNIOR *et al.*, 2017).

2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da infecção causada pelo *T. cruzi* depende da fase da doença e baseia-se no histórico epidemiológico, na clínica do indivíduo e em resultados laboratoriais. Na fase aguda, a presença do parasita no sangue periférico, sinais clínicos como febre prolongada, fraqueza

intensa, inchaço no rosto e pernas, e investigação epidemiológica considerando migração ou exposição do indivíduo a locais de risco definem a positividade para a infecção. Já na fase crônica, a suspeita de infecção baseia-se em achados clínicos, histórico epidemiológico e pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi*. No entanto, a maioria dos casos são assintomáticos, não havendo sinais e sintomas da doença. Assim, o diagnóstico deve considerar histórico epidemiológico, como por exemplo ter contato com o triatomíneo, residir ou possuir histórico de viagens para regiões endêmicas, ter familiares ou pessoas próximas com diagnóstico de DC e ter sido receptor de hemoderivados antes de 1992 (BRASIL, 2013a). No contexto do diagnóstico laboratorial, a escolha da metodologia adequada depende da fase da infecção. De fato, na aguda os exames parasitológicos são os mais adequados. Já na fase crônica, prioriza-se o uso de testes sorológicos, por meio da detecção dos anticorpos contra o parasito (BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000). Nos hemocentros, em especial, é obrigatório o uso de um teste sorológico de alta sensibilidade, podendo ser utilizados os métodos imunoenzimáticos ou quimiluminescentes (BRASIL, 2017).

2.6.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico é o mais indicado e empregado na fase aguda ou para avaliação de reativação (reagudização) da doença, independente da forma de transmissão. Para esta finalidade, investiga-se a presença do *T. cruzi* no sangue periférico através do exame a fresco, que consiste na análise de 200 campos do material biológico disposto entre lâmina e lamínula com o aumento de 400x (Figura 12). Também é recomendado o uso simultâneo de diferentes métodos parasitológicos diretos como, por exemplo, um método de concentração e gota espessa ou esfregaço sanguíneo corados. Os métodos de concentração mais comumente usados são o de Strout, micro-hematócrito e creme leucocitário, todos eles com elevada sensibilidade na fase aguda (LUQUETTI; SCHMUÑIS, 2010). Já os métodos de gota espessa e esfregaço sanguíneo corados apresentam variação da sensibilidade a depender do nível de parasitemia (RASSI *et al.*, 1992; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; LUQUETTI; RASSI, 2000). Quanto ao resultado, se o exame a fresco e de concentração forem negativos é recomendada uma nova coleta até a confirmação ou desaparecimento dos sintomas, ou até mesmo a realização de outras metodologias (CERISOLA *et al.*, 1972; BRASIL, 2005; BRASIL, 2013b; BRASIL, 2014b). O diagnóstico parasitológico indireto também pode ser utilizado na fase aguda através do xenodiagnóstico, hemocultivo ou inoculação em animais de laboratório. Todavia apresentam limitações consideráveis e, atualmente, a utilidade destas

técnicas limita-se ao isolamento de cepas para estudos específicos (KIPNIS *et al.*, 1983; LUQUETTI; RASSI, 2000). Uma outra possibilidade de diagnóstico na fase aguda é a amplificação de fragmentos de kDNA do *T. cruzi*, através da reação em cadeia da polimerase, conhecida como PCR (GONZALEZ *et al.*, 1984; ASHALL *et al.*, 1988). É uma técnica de alta sensibilidade na fase aguda e possibilita utilizar amostras de sangue do paciente (BRENIÈRE *et al.* 1995; RUSSOMANDO *et al.*, 1996).

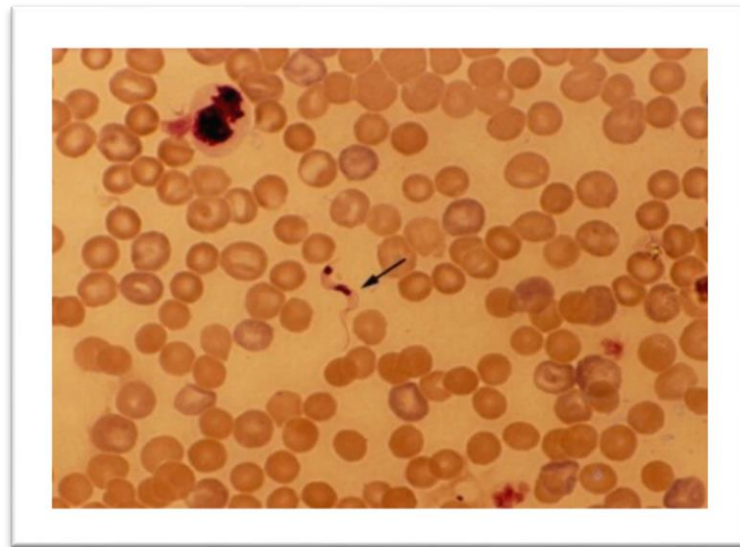


Figura 12: Esfregaço sanguíneo para teste parasitológico direto com sangue a fresco.

Legenda: Forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Fred Santos, acervo pessoal.

2.6.2 Diagnóstico Sorológico

Dada a história natural da DC, a fase crônica é marcada por uma intensa diminuição da parasitemia e produção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* (Figura 7). Por conta destas características, os imunoenaios indiretos são amplamente empregados no diagnóstico e na triagem sorológica em bancos de sangue (LUQUETTI; RASSI, 2000). Entretanto, os parâmetros de desempenho dos imunoenaios são variáveis e dependem de uma série de fatores, como a variabilidade genética das cepas circulantes e matriz antigênica empregada para a captura de anticorpos anti-*T. cruzi* (ZINGALES, 2018). O Quadro 1 apresenta os parâmetros de desempenho de imunoenaios utilizados para triagem sorológica em bancos de sangue. Diversas metodologias já foram descritas para o diagnóstico da DC na fase crônica, todavia o ELISA (*enzyme linked-immunosorbent assay*), a imunofluorescência indireta (IFI),

a hemaglutinação indireta (HAI) e, mais recentemente, a quimiluminescência são as mais utilizadas (BRASIL, 1998; BRASIL, 2005; OMS, 2002).

Quadro 1 – Sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos empregados em bancos de sangue para a triagem sorológica da DC crônica.

MÉTODO	AUTORES	FABRICANTE	SEN (%)	ESP (%)
ELISA	Carvalho <i>et al.</i> , 1993	*	100	99
	Brashear <i>et al.</i> , 1995	*	*	99
	Hammerschlag, 1997	Abbott	100	95
		Biolab-Merieux	100	87
		Gull Laboratories	100	97
	Gomes <i>et al.</i> , 2001	EIE-Recombinante-Chagas-Bio-Manguinhos	100	100
	Caballero <i>et al.</i> , 2007	ELISA IMT	100	98
		Chagas III	100	99
		ELISAcruzi	100	97
		Chagastek	100	98
		Chagastest Rec v3.0	100	100
		Pathozyme Chagas	100	100
	Tobler <i>et al.</i> , 2007	ELISA	98	100
	Gorlin <i>et al.</i> , 2008	ELISA	100	98
	Remesar <i>et al.</i> , 2009	Chagatek	99	99
		Bioschile	94	98
		Biozima Chagas	97	99
		Chagatest rec	95	98
	Gómez <i>et al.</i> , 2019	HBK 401 Hemobio Chagas	100	100
		Chagas ELISA	98	98
		Chagatek	99	99
		Teste Premier Chagas IgG	94	100
		ELISA para Chagas	99	100
		Bioelisacruzi	98	99
		Anticorpos Abbott Chagas	99	98
		Teste de Chagas IICS	97	99
		ELISA para Chagas	99	100
		Bioelisa Chagas	100	99
	Chagas Hemagen	100	97	
	Praast <i>et al.</i> , 2011	bioMérieux ELISA cruzi	98	99
Añez <i>et al.</i> , 2010	*	100	77	
	Pharmatest	88	82	
	Chagastest	88	68	
	Chagastest Recombinante V.3.0	92	82	
	Chagas III	85	82	
De Marchi <i>et al.</i> , 2011	CL-ELISA (EpEx)	99	86	
	CL-ELISA (tGPI mucin)	100	100	
	Teste comercial	100	100	
Peverengo <i>et al.</i> , 2018	*	100	100	
Pirard <i>et al.</i> , 2005	Chagatest	98	99	
	BIOSChile	99	95	
CLIA	Praast <i>et al.</i> , 2011	ARCHITECT Chagas assay	99	99

FC	Zuna; De-Muynck, 1979	*	93	100	
	Andrade <i>et al.</i> , 1992	*	100	*	
HAI	Zuna; De-Muynck, 1979	*	98	100	
	Andrade <i>et al.</i> , 1992	*	50	*	
	Wendel, 1993	*	99	99	
	Pirard <i>et al.</i> , 2005	HAI RBB	96	87	
	Remesar <i>et al.</i> , 2009	HAI LC	65	96	
	Gómez <i>et al.</i> , 2019	Chagas HAI Immunoserum		98	79
		Teste Chagas-HAI		88	60
		Imuno-HAI Chagas		100	96
		Chagas Hemagen		92	89
Hemacruzi		99	97		
De Marchi <i>et al.</i> , 2011	*	98	100		
Peveerengo <i>et al.</i> , 2018	*	92,5	100		
IB	Gómez <i>et al.</i> , 2019	*	98	100	
IFI	Zuna; De-Muynck, 1979	*	99	100	
	Lorca <i>et al.</i> , 1992	*	64	93	
	Hamerschlak, 1997	*	100	56	
	Gómez <i>et al.</i> , 2019	*	98	98	
	Añez <i>et al.</i> , 2010	*	100	77	
	De Marchi <i>et al.</i> , 2011	*	99	100	
IP	Lorca <i>et al.</i> , 1992	*	97	100	
LIA	Saez-alquezar <i>et al.</i> , 2000	INNO-LIA Chagas assay	99	98	
PA	Remesar <i>et al.</i> , 2009	Chagas Serodia	90	97	
RIPA	Gómez <i>et al.</i> , 2019	*	100	100	
RPHA	Hamerschlak, 1997	*	91	89	
TAD	Añez <i>et al.</i> , 2010	*	77	89	
TIA	Remesar <i>et al.</i> , 2009	*	83	100	
TR	Luquetti <i>et al.</i> , 2003	Chagas StatPak	100	98,6	
		Serodia-Chagas	100	98	
	Gómez <i>et al.</i> , 2019	Teste de anticorpo ID- Chagas	97	100	
		Testes rápidos	94	96	
		Chagas Stat-Pak	100	100	
	Añez <i>et al.</i> , 2010	Stat Pak Assay	85	82	
TSSA	De Marchi <i>et al.</i> , 2011	TSSA VI	100	100	
		TSSA I	99	94	
WB	Gómez <i>et al.</i> , 2019	*	98	100	

Nota: * Sem informação disponível.

Legenda: CL-ELISA (*chemiluminescent Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*); CLIA (Quimiluminescência); ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*); FC (fixação de complemento); HAI (hemaglutinação indireta); IB (immunoblot); IFI (imunofluorescência indireta); IP (teste de imunoperoxidase); LIA (lise de lipossomas); PA (*Passive Particle Agglutination*); RIPA (ensaio de radioimunoprecipitação); RPHA (hemaglutinação passiva reversa); TAD (aglutinação direta); TIA (*trans-sialidase inhibition assay*); TR (teste rápido); TSSA (*termed trypomastigote small surface antigen*); WB (*Western blot*).

Fonte: A autora

2.6.2.1 ELISA (*enzyme linked-immunosorbent assay*)

Trata-se de um ensaio imunoenzimático baseado na interação antígeno-anticorpo. Os antígenos são adsorvidos na fase sólida das placas de microtitulação (Figura 13). Em seguida, o material biológico (soro ou plasma) é adicionado às cavidades e a placa incubada a 37°C, favorecendo a interação antígeno-anticorpo. Posteriormente adiciona-se uma anti-imunoglobulina conjugada a uma enzima, a qual interage com o anticorpo da amostra. Na etapa seguinte, o revelador (substrato) é adicionado e provoca a alteração da cor do meio, a qual será mensurada por um espectrofotômetro, após adição da solução de parada.

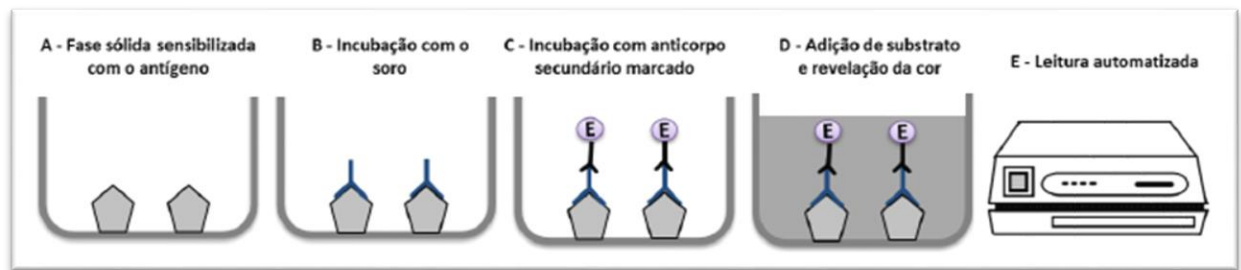


Figura 13 - Esquema do teste de ELISA.

Legenda: 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).

Fonte: SANTOS *et al.*, 2016.

Os testes de ELISA são classificados de acordo com a preparação antigênica usada para sensibilização das microplacas. Os ensaios convencionais utilizam extratos brutos ou antígenos semipurificados de cepas do *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* spp. (CORDERO *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 1992; SANTOS *et al.*, 2012). Tais deficiências podem ser corrigidas com os testes não convencionais, os quais empregam antígenos específicos, identificados e purificados através de técnicas de biotecnologia. Estes antígenos podem ser de dois tipos: recombinantes ou recombinantes quiméricos.

Diversos antígenos recombinantes já foram sintetizados através de técnicas de engenharia genética e avaliados tanto em testes diagnósticos (Silveira *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2009; DA COSTA *et al.*, 2012) quanto em ensaios de vacinação (ARCE-FONSECA *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2005). A avaliação de seu uso em sorodiagnóstico foi

realizada por diferentes estudos, revelando elevados valores de sensibilidade e especificidade diagnósticas, 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 (SILVEIRA *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2009; DA COSTA *et al.*, 2012). Assim sendo, uma série de peptídeos recombinantes já foram utilizados para o diagnóstico sorológico, alguns dos quais possuem em sua constituição sequências de aminoácidos conservados e dispostos em *tandem*, aumentando, portanto, o seu reconhecimento pelos anticorpos presentes no soro dos indivíduos portadores da DC, quando comparados aos extratos brutos do parasito. Todavia, a despeito dos avanços alcançados, resultados falso-negativos continuaram a ser obtidos indicando que a utilização de um único antígeno recombinante não é capaz de diagnosticar todos os indivíduos portadores da DC (VERGARA *et al.*, 1991). Tal limitação deve-se a própria natureza do antígeno recombinante, ou seja, a variedade limitada de epítomos presentes em um único antígeno isolado. Uma alternativa para ultrapassar este obstáculo baseia-se na combinação de dois antígenos recombinantes em um único teste, verificando um aumento significativo da sensibilidade sem perda de especificidade (VERGARA *et al.*, 1991).

Desde então, combinações de diferentes antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos foram testadas utilizando diferentes formatos e plataformas diagnósticas (CAMUSSONE *et al.*, 2009; VERGARA *et al.*, 1991; ALMEIDA *et al.*, 1990; MONCAYO; LUQUETTI, 1990). Em geral, as misturas apresentam alta sensibilidade e especificidade confirmando o potencial dos antígenos recombinantes do *T. cruzi* no sorodiagnóstico da DC. Apesar do alto desempenho dos testes diagnósticos utilizando uma mistura de antígenos recombinantes, dada a heterogeneidade antigênica do parasita, diferentes resultados de sensibilidade e especificidade foram relatados (ZINGALES, 2018). Uma forma de aperfeiçoar os testes diagnósticos, reduzindo a possibilidade de reações falso-negativas e de reações cruzadas, consiste na utilização de proteínas sintéticas formadas por epítomos conservados e repetitivos de diferentes proteínas em uma única molécula recombinante gerando um antígeno recombinante quimérico, poliantígeno ou antígeno multi-epítomo (CAMUSSONE *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2017a).

2.6.2.2 Imunofluorescência Indireta (IFI)

O teste de imunofluorescência indireta é amplamente utilizado e já foi considerado referência na sorologia da DC. Foi desenvolvido em 1960 e, naquela época, foi relatada

sensibilidade e especificidade de 98% (CAMARGO, 1966; HABERLAND *et al.*, 2013). Sua realização baseia-se na incubação de formas epimastigotas fixadas em lâminas de vidro com anticorpos presentes no soro diluído em tampão (Figura 14). Após sucessivas lavagens, a lâmina é incubada com anticorpo anti-imunoglobulina humana conjugado a fluoresceína. Resultados positivos apresentam fluorescência, que pode ser visualizada em um microscópio de fluorescência (LUQUETTI; RASSI, 2000). Apesar de ser um método de alta sensibilidade, existem limitações, como por exemplo a necessidade de equipamento adequado, profissionais capacitados e uma padronização rigorosa (FERREIRA; AVILA, 2001). Além disso, por utilizar o parasita inteiro, é uma metodologia susceptível a resultados falso-positivos, em especial em área de co-endemicidade entre o *T. cruzi* e espécies do gênero *Leishmania* spp. (DALTRO *et al.*, 2019).

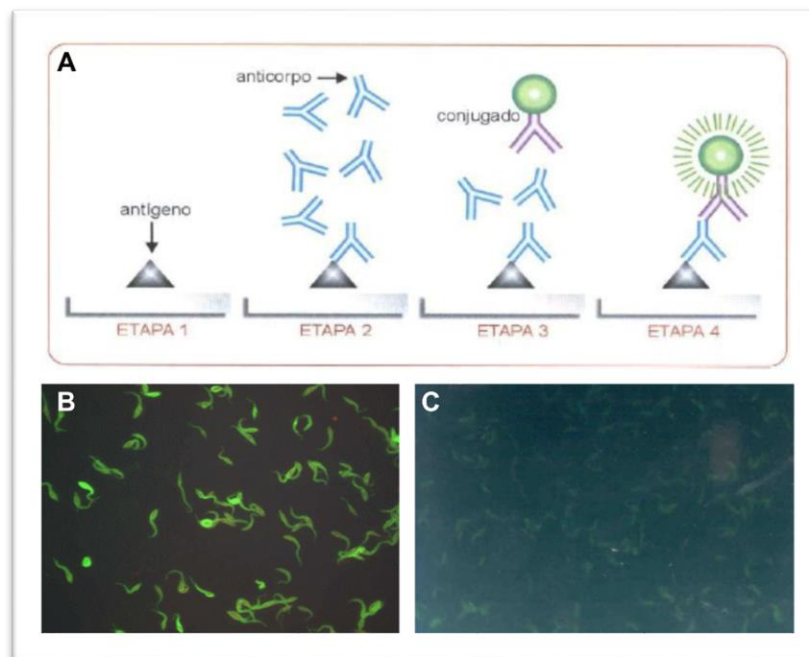


Figura 14: Representação esquemática da IFI positiva.

Legenda: (A) Desenho esquemático da reação de IFI; (B) Reação positiva; (C) Reação negativa.

Nota: *T. cruzi* fixado numa lâmina de vidro com regiões demarcadas (etapa 1). Posteriormente é adicionada a amostra diluída que, sendo reagente, contém anticorpos específicos que se ligam ao antígeno (etapa 2) e adiciona-se o conjugado composto de uma antiimunoglobulina humana ligada ao isotiocianato de fluoresceína (etapa 3). Por fim, interação antígeno/anticorpo é evidenciada por meio da fluorescência do parasita (etapa 4).

Fonte: Ministério da Saúde, 1998.

2.6.2.3 Hemaglutinação Indireta (HAI)

Esta técnica baseia-se na aglutinação de hemácias sensibilizadas com proteínas do *T. cruzi* na presença de anticorpos presentes no soro dos indivíduos. Após a reação é possível visualizar a formação de aglutinação no fundo da placa de microtitulação (Figura 15). A metodologia foi padronizada em 1962 e ainda é utilizada no diagnóstico da DC (CERISOLA; CHABEN; LAZZARI, 1962). Apesar de simples, de baixo custo e possibilitar leitura visual, o desempenho do teste é bastante variável, com sensibilidade de 82 a 100% e especificidade de 54 a 100%. Muitos resultados falso-negativos foram relacionados a esta metodologia, desencorajando o seu uso na triagem sorológica (FERREIRA; AVILA, 2001; OMS, 2002; GADELHA *et al.*, 2003)

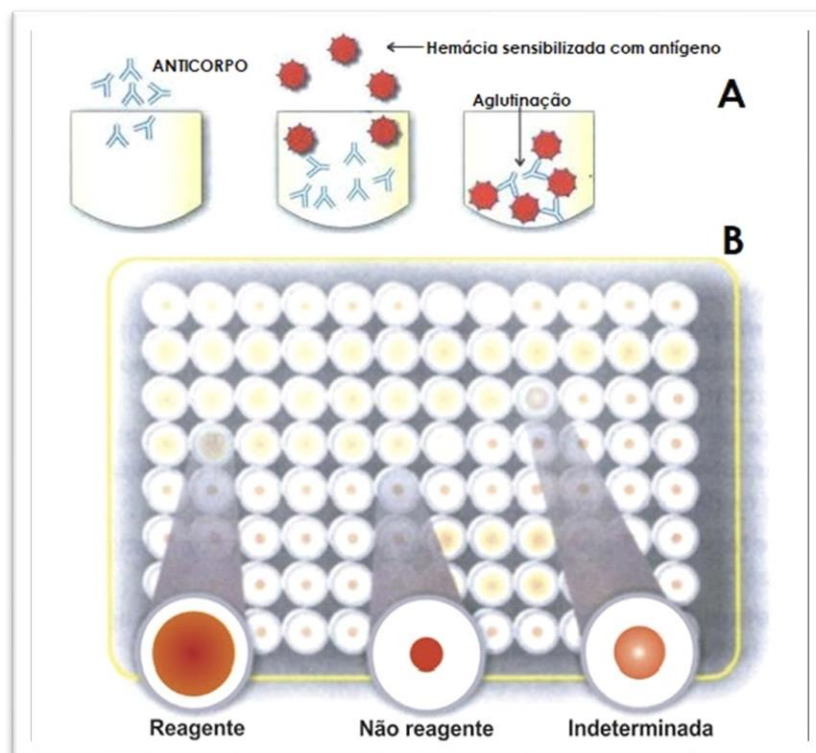


Figura 15: Representação esquemática de uma reação de hemaglutinação indireta (HAI) positiva

Nota: (A) Desenho esquemático da reação de HAI; (B) Interpretação do teste.

Fonte: Ministério da Saúde, 1998.

2.6.2.3 Quimiluminescência (CLIA)

O primeiro protótipo de um imunoenensaio quimiluminescente foi desenvolvido em 1983, por Anthony Campbell e Ashok Patel, sua utilidade cresceu bastante, primeiro na área de química e atualmente para o diagnóstico das doenças infecciosas (MAHLER *et al.*, 2016). Este ensaio se baseia na emissão de luz e calor devido a uma reação química, gerando energia luminosa (WANG, 2016). Durante o imunoenensaio, os reagentes se transformam em estados intermediários eletronicamente excitados, e ao passarem para um estado de menos excitação, liberam a energia absorvida na forma de luz. A reação quimiluminescente, detectada pelo instrumento (luminômetro), é desencadeada pela adição de peróxido e luminol. Além de sua alta sensibilidade, a CLIA tem como vantagens uma execução simples, segura e rápida (ALMEIDA; RODRIGUES; TRAVOSSOS, 1994). Sua capacidade discriminatória tem sido relatada, amostras com resultados duvidosos são, geralmente, classificadas corretamente por esta técnica, apesar do elevado custo (CHANG *et al.*, 2006; PÉREZ-AYALA *et al.*, 2018; PRAAST *et al.*, 2011). A CLIA possui uma alta sensibilidade devido ao baixo *background* e a amplitude da faixa dinâmica (LAKOS *et al.*, 2014).

2.7 BANCOS DE SANGUE

Na maioria dos países endêmicos, o perfil clássico da transmissão da DC mudou em virtude do êxodo rural, industrialização, aumento da migração populacional e sucesso das campanhas de combate ao inseto vetor. Vias de transmissão anteriormente consideradas secundárias ganharam maior visibilidade, tais como a transfusional (MORAES-SOUZA, FERREIRA-SILVA, 2011; DIAS, SCHOFIELD, 1998). O primeiro relato de transmissão sanguínea do *T. cruzi* foi na Argentina, em 1936 (MAZZA *et al.*, 1936). No Brasil, os primeiros relatos datam do ano de 1949 (PELLEGRINO, 1949), sendo sugerida a triagem sorológica dos doadores para prevenir a transmissão da DC por transfusão. Quatro anos antes, em 1945, recomendou-se a exclusão da doação de portadores da DC (DIAS, 1945). No ano de 1969, a triagem sorológica tornou-se obrigatória em todo o território nacional segundo a Portaria n. 4, de 1969 (BRASIL, 1970). Em alguns países, tal obrigatoriedade ocorreu antes do Brasil, como na Argentina, que instituiu políticas sobre o assunto em 1967. Por outro lado, a Colômbia só tornou a triagem obrigatória em seus bancos de sangue em 1995 (OTANI, 2003). Em virtude da ausência de um teste de referência capaz de diagnosticar a DC com segurança na fase crônica, o Brasil adotou, em 1988, em seus bancos de sangue as

recomendações preconizadas pela OMS, tornando obrigatória a realização de dois imunoenaios com princípios metodológicos diferentes para a triagem sorológica da DC, segundo a Lei n. 7.649, de 1988 (BRASIL, 1988).

Com o tempo a DC mostrou-se de extrema importância em toda a América Latina, com grande impacto devido a sua elevada prevalência, incidência, morbimortalidade e danos à saúde (BRASIL, 2014a; DIAS *et al.*, 2016). O grande volume de casos fatais demandou esforços e articulações para ações de vigilância em saúde. Desta forma, foi criado, em 1991, pelos Ministérios da Saúde dos países do Cone Sul, a Comissão Intergovernamental para a Eliminação do *T. infestans* e a Interrupção da Tripanossomíase Americana Transfusional na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai. Nesta ocasião, não se reconheceu somente a importância da DC transfusional, mas admitiu-se a necessidade de políticas públicas efetivas no controle da transmissão por esta via (DEL CONO SUR, 1993; DIAS, SCHOFIELD, 1998).

Tendo em vista a importância da DC transfusional para a saúde pública, outras medidas legais foram tomadas para garantir a biossegurança das bolsas transfundidas, como por exemplo a Lei Nº 10.205 que proíbe a remuneração ao doador pela doação de sangue, sendo apenas para a utilização exclusiva da doação voluntária, levando em consideração que até os anos 70 e 80 era comum a doação remunerada (BRASIL 2001; DIAS, SCHOFIELD, 1998). Atualmente, a resolução que regulamenta todos os procedimentos para doação de sangue é a RDC n. 343, de 2002, que retirou a obrigatoriedade da realização de dois testes. A triagem sorológica deve ser feita por um teste de alta sensibilidade (ANVISA, 2002).

Requisitos da Portaria n.º 158 de 2016 (BRASIL, 2016) estabelecem os impedimentos para a doação de sangue, os quais visam garantir a segurança e proteção tanto de doadores quanto receptores; são eles: pesar mais de 50 kg, possuir boa saúde e ser maior de idade. Alguns requisitos estabelecem impedimentos temporários, tais como sinais e sintomas de gripe ou resfriado, pós-gravidez, período de amamentação, realização de tatuagens ou colocação de *piercings* nos últimos 12 meses, ter realizado endoscopia nos últimos 6 meses e ter se colocado em risco de adquirir infecções sexualmente transmissíveis no período de 12 meses. Por fim, a Portaria n.º 158 também define impedimentos definitivos, como a infecção pelos vírus da hepatite B (HBV) e C (HBC), da imunodeficiência adquirida (HIV-1/2) e pelo vírus linfotrópico de células T do adulto (HTLV-1/2), além de indivíduos com diagnóstico positivo da sífilis e da DC. Adicionalmente, usuários de drogas injetáveis são impedidos de doar sangue. Tais critérios são relevantes para evitar a transmissão de doenças, visto que há um

período conhecido como “janela imunológica”, espaço de tempo entre a infecção e a positividade dos testes (BRASIL, 2018).

O risco de um receptor ser infectado pelo *T. cruzi* depende de alguns fatores, como a presença do parasito no sangue ou componente sanguíneo transfundido, o seu estado imunológico e o desempenho diagnóstico dos ensaios empregados (SCHOFIELD; JANIN; SALVATELLA, 2006). Este último fator consiste em um grande desafio dada a ausência de testes de referência para o diagnóstico sorológico da DC. Além deste fato, sabe-se que a DC está entre as 10 causas de inaptidão para doação de sangue, justificando a busca por marcadores sorológicos capazes de fornecer resultados seguros. De fato, dados da ANVISA revelaram inaptidão em 0,34% (~90.000 bolsas) das 2.505.158 bolsas coletadas no ano de 2013. A DC ficou atrás somente da triagem para HBV, sífilis e HIV com 0,57%, 0,76% e 0,36%, respectivamente (ANVISA, 2015).

Diferente do preconizado anteriormente, a triagem sorológica no Brasil deve ser realizada por apenas um único teste de elevada sensibilidade. Além disso, a metodologia de escolha deve ser rápida, de baixo custo e fácil execução (BRASIL, 2004). De fato, este procedimento melhora a operacionalização dos Hemocentros, visto que a realização concomitante de dois testes impacta negativamente na rotina laboratorial, aumentando tempo de análise das amostras, bem como o custo da triagem. Assim, a maioria dos Hemocentros do país, incluindo a Fundação HEMOBA, utilizam métodos quimiluminescentes em sua rotina. Por este motivo, a busca de marcadores sorológicos de elevada acurácia diagnóstica torna-se extremamente necessária.

A Fundação HEMOBA segue as recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) para a triagem sorológica da DC. O fluxograma da figura 16 ilustra as etapas para a testagem e liberação das bolsas. O indivíduo é considerado apto à doação caso o seu resultado não seja reagente (negativo). Todavia, se o resultado for reagente (positivo ou inconclusivo) o teste de CLIA deve ser repetido em duplicata utilizando a mesma amostra. Após repetição, caso o resultado permaneça reagente (positivo ou inconclusivo) o candidato a doação é convocado para uma segunda coleta. Contudo, se o resultado da repetição não for reagente, o candidato é considerado apto para doação e sua bolsa é liberada para doação. Com a confirmação do resultado falso positivo, a equipe responsável pelo setor de sorologia do hemocentro deve investigar as possíveis causas que levaram ao erro na triagem inicial.

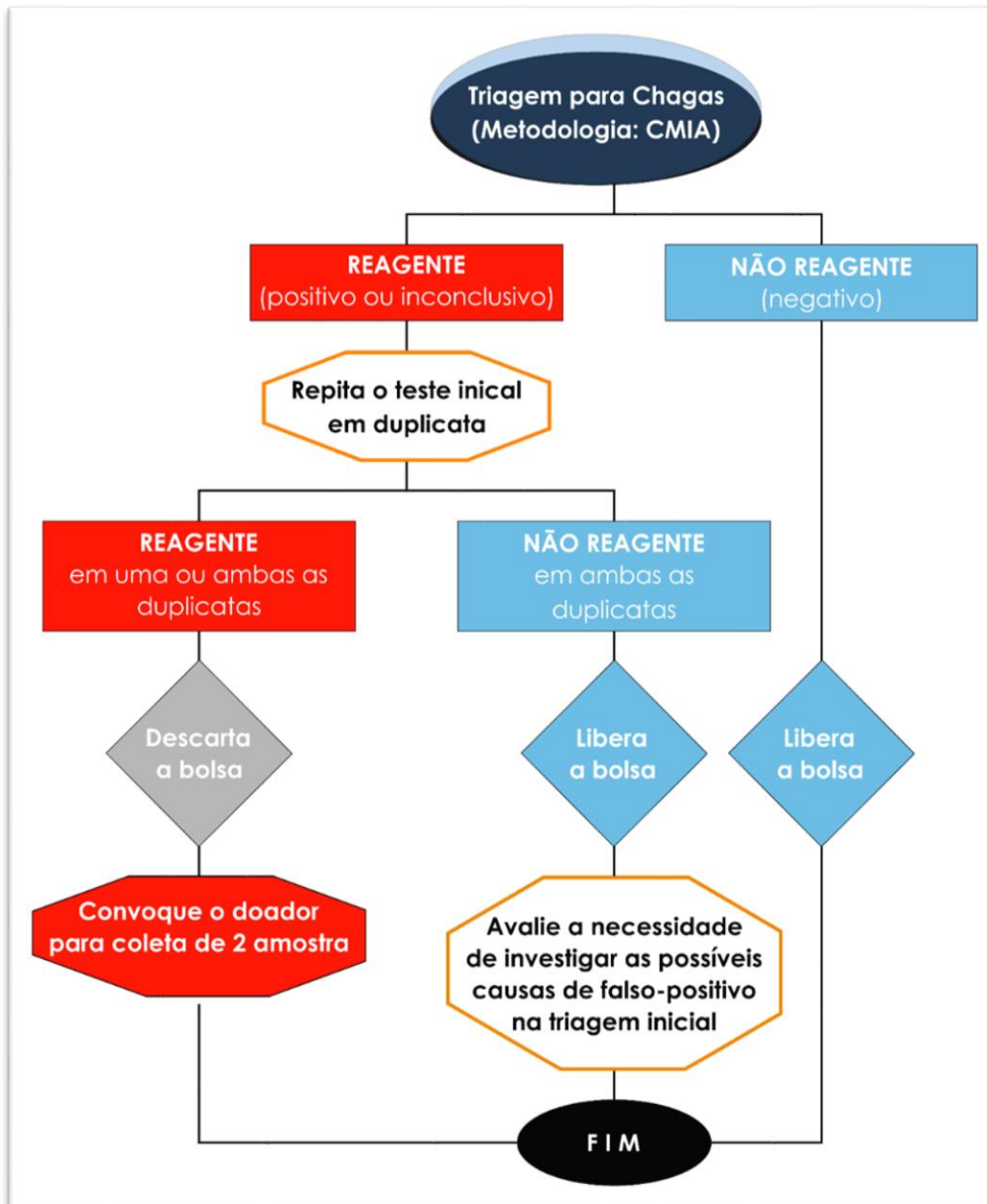


Figura 16 - Fluxograma para a testagem e liberação de bolsas de sangue na triagem sorológica para DC na Fundação HEMOBA.

Fonte: Imagem cedida pela Fundação HEMOBA.

2.8 ANTÍGENOS IBMP

Conforme mencionado anteriormente, a utilização de proteínas recombinantes quiméricas do *T. cruzi* nos testes diagnósticos possui uma série de vantagens, tais como a elevação da sensibilidade e especificidade, redução de reatividade cruzada e maior reprodutibilidade entre os ensaios (SANTOS *et al.*, 2016b; SANTOS *et al.*, 2017a). Recentemente, quatro antígenos recombinantes quiméricos foram sintetizados e seu potencial diagnóstico avaliado (SANTOS *et al.*, 2016b; SANTOS *et al.*, 2017a; DALTRO *et al.*, 2019; DEL-REI *et al.*, 2019). As

quatro proteínas foram obtidas através de técnicas de engenharia genética e utilizadas para a realização do presente estudo. Os antígenos, denominados IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 (acrônimos para o Instituto de Biologia Molecular do Paraná), foram padronizados para diagnóstico sorológico em humanos, por meio do estudo de fase I e II (SANTOS *et al.*, 2016b; SANTOS *et al.*, 2017a) e, mais recentemente, foram avaliados para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* (IgG) em soros de cães (LEONY *et al.*, 2019). Trata-se de quatro antígenos recombinantes quiméricos formados por sequências imunodominantes preservadas e repetitivas de diversas proteínas do *T. cruzi* (Quadro 2). As sequências que compõem cada antígeno quimérico foram escolhidas na literatura com base em avaliações prévias do potencial diagnóstico das proteínas nativas (SANTOS *et al.*, 2016b).

Quadro 2 - Composição dos antígenos recombinantes IBMP.

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

Fonte: Modificado de SANTOS (2016).

O estudo de fase I consistiu na primeira avaliação usando os quatro antígenos, e objetivou analisar o potencial diagnóstico das moléculas em diferenciar indivíduos negativos de positivos para a DC crônica utilizando o ELISA e o microarranjo líquido (Luminex) como plataformas diagnósticas. Para esta finalidade, foi utilizado um painel sorológico contendo 280 amostras positivas e 20 negativas para a DC. Adicionalmente, foram realizadas avaliações estruturais das moléculas através das técnicas de dicroísmo circular e espalhamento dinâmico da luz. Os resultados demonstraram alta capacidade discriminatória das quatro proteínas, visto que os valores de AUC (Área abaixo da curva) foram superiores a 98%

(SANTOS *et al.*, 2016b). Com base nos resultados obtidos, os quatro antígenos foram submetidos ao estudo de fase II.

O estudo de fase II, por sua vez, teve como objetivo determinar os parâmetros de desempenho das quatro moléculas utilizando um quantitativo amostral bem caracterizado e estatisticamente calculado. Assim, foram incluídas 857 amostras positivas para a DC crônica e 689 negativas, bem como 1.079 amostras positivas para outras doenças infecto-parasitárias objetivando investigar a incidência de reatividade cruzada. As moléculas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 apresentaram sensibilidade de 97,4%, 94,3%, 97,9% e 99,3%, e especificidade de 99,4%, 99,6%, 99,9% e 100%, respectivamente. Neste estudo, observou-se que o desempenho diagnóstico foi superior ao de testes comerciais disponíveis no Brasil. Foi demonstrado também um baixo índice de reatividade cruzada e elevada reprodutibilidade intra-teste, inter-teste e inter-laboratorial. (SANTOS *et al.*, 2017a). Estas avaliações foram realizadas utilizando o ELISA indireto como plataforma diagnóstica. Em seguida, o desempenho das moléculas foi também avaliado utilizando outras metodologias, como o microarranjo líquido (LMA) e a imunocromatografia de duplo percurso. Na análise por LMA, as moléculas foram investigadas usando um painel sérico de 1.333 soros positivos e negativos para a DC, além de 851 amostras positivas para outras doenças infecto-parasitárias. Os resultados foram semelhantes aos encontrados anteriormente no ELISA (SANTOS *et al.*, 2017b). Resultados semelhantes foram obtidos nos ensaios imunocromatográficos (SILVA, 2016; SILVA *et al.*, 2020).

Apesar das quatro moléculas apresentarem altos valores de sensibilidade e especificidade, os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 foram os de maior acurácia, sendo, portanto, eleitos para avaliação diagnóstica de indivíduos infetados com outras DTUs do *T. cruzi* residentes tanto em áreas endêmicas quanto não endêmicas. Em áreas endêmicas, a avaliação do desempenho diagnóstico foi realizada utilizando amostras positivas e negativas de indivíduos provenientes de diversas províncias da Argentina, Bolívia e Paraguai, locais de circulação de distintas cepas do *T. cruzi* (DEL-REI *et al.*, 2019). Já a avaliação realizada em áreas não endêmicas, foram usadas amostras séricas de imigrantes latino-americanos residentes em Barcelona-Espanha (DOPICO *et al.*, 2019). Em ambos os estudos, os valores de desempenho foram semelhantes aos encontrados anteriormente, corroborando a hipótese de que os antígenos quiméricos IBMP são capazes de diagnosticar a infecção causada pelo *T. cruzi* independente da cepa infectante, apesar da grande variabilidade genética descrita para a espécie (BRENIERE; WALECKX; BARNABE, 2016).

Os estudos de fase I e II, por definição, utilizam amostras positivas e negativas para o agravo em estudo. O perfil sorológico das amostras precisa ser bem estabelecido. Sendo assim, as amostras que participaram das investigações acima foram classificadas como negativas ou positivas conforme o preconizado pela OMS, ou seja, os resultados foram definidos com base na concordância de dois testes comerciais com preparações antigênicas e/ou princípios metodológicos distintos. Como não há um teste de referência (padrão-ouro) para a DC crônica, qualquer teste comercial usado para esta finalidade pode fornecer resultados imperfeitos. Por este motivo, no ano de 2018, foi realizado um estudo no qual a análise de classe latente (LCA) foi empregada como teste de referência para classificar as amostras como positivas ou negativas para a DC (SANTOS *et al.*, 2018). A LCA consiste em uma ferramenta estatística utilizada para avaliar novos testes na ausência de testes de referência, embora o verdadeiro status da doença permaneça desconhecido, os métodos de avaliação disponíveis oferecem uma aproximação do estado real da doença. Consequentemente, a probabilidade de uma dada combinação de resultados de testes produz um status de classe latente, isto é, status de doença. Neste estudo, as amostras foram submetidas individualmente ao diagnóstico utilizando os antígenos IBMP e a análise combinada dos resultados foi usada para definir cada amostra como negativa ou positiva para a DC. De acordo com a figura 17, uma amostra foi definida como positiva caso apresentasse reatividade em no mínimo duas moléculas, com probabilidade à posteriori superior a 87% para todas as combinações possíveis. Por outro lado, caso as amostras apresentassem reatividade para somente uma das moléculas ou para nenhuma delas o status sorológico foi definido como negativo, com probabilidade à posteriori inferior ou igual a 0,8%.

	IBMP 8.1	8.2	8.3	8.4	N	PP (%)	LCS
P1	-	-	-	-	278	0.0	NEG
P2	+	-	-	-	1	0.3	NEG
	-	+	-	-	1	0.1	NEG
	-	-	+	-	1	0.3	NEG
	-	-	-	+	1	0.8	NEG
P3	+	+	-	-	0	89.5	POS
	+	-	+	-	0	96.9	POS
	+	-	-	+	0	99.0	POS
	-	+	+	-	0	87.9	POS
	-	+	-	+	0	95.7	POS
	-	-	+	+	2	99.0	POS
	-	-	-	-	0	0.0	POS
P4	+	+	+	-	2	100	POS
	+	+	-	+	6	100	POS
	+	-	+	+	19	100	POS
	-	+	+	+	3	100	POS
P5	+	+	+	+	253	100	POS

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

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

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

Fonte: SANTOS *et al.*, 2018.

Com base na classificação das amostras utilizando a LCA como teste de referência, foi realizado um estudo para avaliar a reatividade cruzada dos antígenos IBMP em 629 amostras de leishmaniose tegumentar e 200 de leishmaniose visceral (DALTRO *et al.*, 2019). Neste modelo, a LCA classificou 82 (9,9%) amostras como co-infectadas pelo *T. cruzi*, sendo excluídas do estudo. Contudo, caso dois testes comerciais fossem utilizados para classificação do status sorológico das amostras, 533 (64,3%) seriam excluídas das análises, impactando negativamente com casuística da investigação. Quanto ao índice de reatividade cruzada, foi demonstrado que os antígenos IBMP apresentam valores inferiores aqueles encontrados para diversos testes comerciais. Por este motivo, no presente estudo, a LCA será utilizada para classificar as amostras provenientes da Fundação HEMOBA como negativas ou positivas para a DC.

Por fim, levando em consideração o desempenho diagnóstico destes antígenos em ensaios humanos, a importância veterinária da DC canina, o papel do cão como reservatório e/ou sentinela biológico e a ausência histórica de testes comercialmente disponíveis para DC em cães, um estudo foi desenvolvido recentemente com o objetivo de avaliar a eficiência destas proteínas em detectar anticorpos anti-*T. cruzi* em cães cronicamente infectados. Nesta avaliação foram usadas amostras positivas de animais experimentalmente infectados com cepas conhecidas do parasita e de cães naturalmente infectados, além de amostras negativas para a DC e positivas para outras doenças infecto-parasitárias. Os resultados encontrados mostraram que as quatro moléculas possuem elevada capacidade em diferenciar o grupo de animais negativos do grupo de animais positivos (AUC superior a 96%). Das quatro moléculas, a IBMP-8.3 e IBMP-8.4 mostraram-se mais promissoras para o diagnóstico em cães (LEONY *et al.*, 2019). Um estudo de fase II encontra-se em curso neste momento com o objetivo de validar esta hipótese.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os antígenos quiméricos IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 do *Trypanosoma cruzi* na triagem sorológica da DC em bancos de sangue.

3.2 Objetivos específicos

- Classificar o perfil sorológico das amostras inscritas no estudo através da análise de classe latente (LCA);
- Avaliar o desempenho individual dos antígenos para a triagem da DC (estudo de fase III);
- Avaliar a reatividade cruzada e coinfeção utilizando amostras séricas de doadores de sangue positivos para doenças infecto-parasitárias;
- Avaliar a utilização conjunta dos antígenos quiméricos para a triagem sorológica para a DC em banco de sangue.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTOS DO ESTUDO

Trata-se de um estudo prospectivo de validação de métodos, no qual objetiva determinar o desempenho de testes utilizando amostras de indivíduos da população com condição sorológica desconhecida para a doença alvo (estudo de fase III). Este tipo de estudo tem como vantagem a possibilidade de determinar dois parâmetros de desempenho: os valores preditivos positivo e negativo. Os resultados serão analisados conjuntamente através da análise de classe latente.

4.1.1 Locais do estudo

A produção e purificação dos antígenos recombinantes IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 foram realizadas no Laboratório de Genômica e de Proteínas do Instituto Carlos Chagas - ICC/FIOCRUZ-PR. A caracterização do painel sorológico e a avaliação do potencial diagnóstico confirmatório dos antígenos IBMP foram realizadas no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), do Instituto Gonçalo Moniz - IGM/FIOCRUZ-BA.

4.1.2 Considerações éticas

Este estudo possui aprovação junto ao Comitê de Ética do IGM/ FIOCRUZ/BA sob o número 2.657.979 (CAAE 67809417.0.0000.0040, Apêndice A). Não existiram riscos físicos para a saúde dos participantes, pois somente amostras previamente coletadas foram utilizadas. Os dados que identifiquem os participantes da pesquisa foram mantidos em absoluto sigilo e, ao invés do nome, o material biológico recebeu um código numérico, mantendo, desta forma, a sua confidencialidade.

4.2 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Os antígenos quiméricos IBMP (Quadro 3) foram obtidos a partir da tecnologia do DNA recombinante no ICC/FIOCRUZ-PR. Após purificação e quantificação foram enviados para o LASP (IGM/Fiocruz-BA) para a realização deste estudo. Detalhes da obtenção dos antígenos podem ser verificados em Santos *et al.* 2017a.

Quadro 3 - Lotes de produção e concentração dos antígenos IBMP

Código	Lote	Concentração (mg/mL)
IBMP 8-1	150613.1	0,5
IBMP 8-2	270613.1	0,7
	180613	2,0
IBMP 8-3	020913.1	1,0
IBMP 8-4	080813.1	1,8
	080813.1	4,2

Fonte: A autora

4.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a chegada dos antígenos ao LASP, a integridade dos mesmos foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Os antígenos IBMP foram preparados e o volume total contendo 1 µg de cada proteína foi aplicado nos géis com 0,75 mm de espessura e submetido à eletroforese com 20 mA de corrente por 1h. Os géis foram corados com azul de Coomassie (Bio-Rad, EUA) e descorados em metanol e ácido acético.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

4.3.1 Dimensionamento amostral

O cálculo amostral foi obtido com auxílio do programa estatístico R (*The R Project for Statistical Computing*, Viena, Áustria) para estimar as proporções, supondo-se sensibilidade de 99% e adotando-se um erro absoluto (semi-amplitude do intervalo de confiança) de 2%, nível de confiança em 95% e prevalência da doença de 0,02% na população brasileira (MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

4.3.2 Obtenção e caracterização do painel sorológico

As amostras séricas foram provenientes de potenciais doadores que compareceram voluntariamente à Fundação Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (Fundação HEMOBA) (Figura 18) no período de dezembro de 2018 a agosto de 2019. As coletas foram realizadas uma ou duas vezes por mês. Após enviadas ao nosso laboratório, as amostras foram armazenadas em tubos criogênicos, identificadas por etiquetas e armazenadas em freezer a -20° C no LASP (IGM/FIOCRUZ-BA) até a realização dos testes sorológicos. Informações sobre os resultados dos testes sorológicos realizados pelo HEMOBA, sexo, idade e local de residência dos doadores inclusos no estudo foram cedidos para o estudo somente após a finalização dos ensaios.

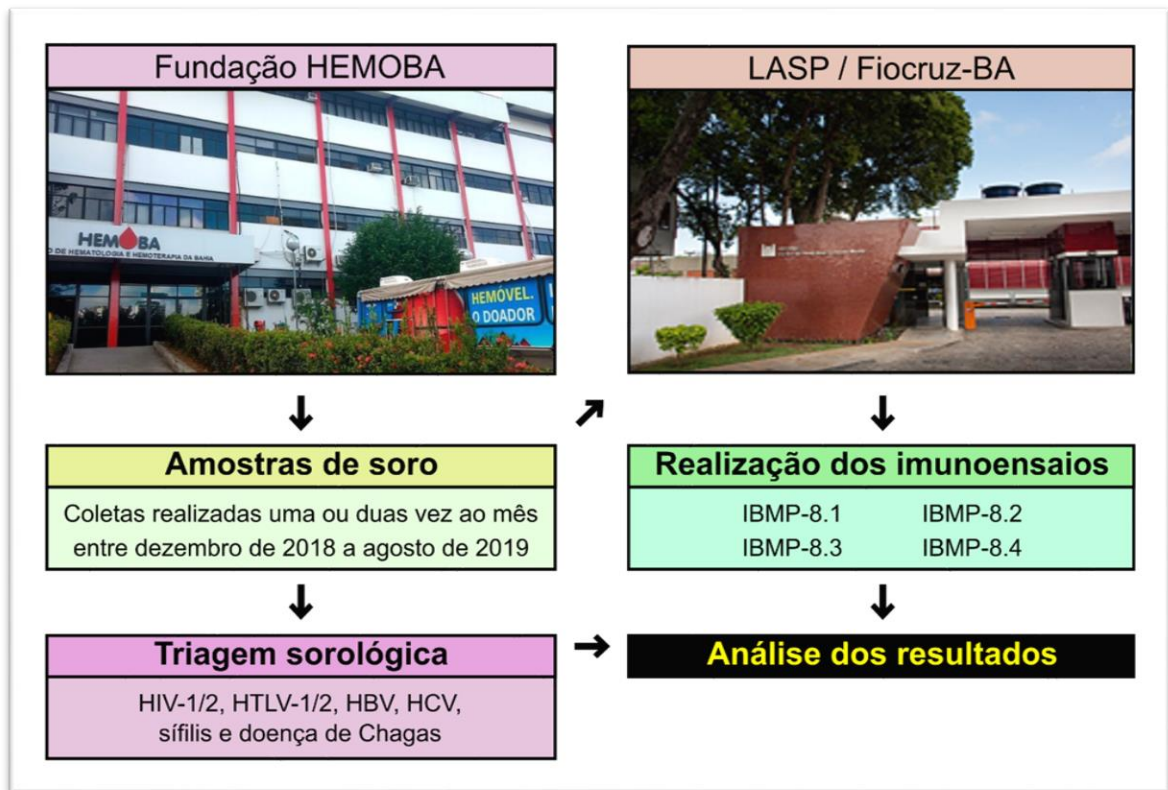


Figura 18: Fluxograma para a obtenção e caracterização amostral.

Nota: Obtenção do painel amostral pela Fundação HEMOBA; realização do ELISA indireto utilizando os antígenos IBMP.

Fonte: A autora.

4.3.4 Critérios de inclusão

Foram incluídas neste estudo todas as amostras séricas de indivíduos que doaram sangue, voluntariamente, para a Fundação HEMOBA, no período de dezembro de 2018 a agosto de 2019.

4.3.5 Critérios de exclusão

Não foram incluídas neste estudo as amostras séricas que apresentaram volumes inferiores a 50 µl, hemólise ou lipemia intensa.

4.4 ELISA INDIRETO

4.4.1 Sensibilização das microplacas com os antígenos IBMP

Os ensaios imunoenzimáticos indiretos no formato ELISA foram padronizados em um estudo anterior, no qual foram descritas as condições ideais dos componentes das reações (SANTOS *et al.*, 2017a). Resumidamente, em microplacas de poliestireno de 96 cavidades de fundo plano (UV-Star[®] Microplate, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria), foram distribuídos, em cada cavidade, 100 µl da solução tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6) contendo 25 ng dos antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 e 12,5 ng da molécula IBMP-8.2. Cada um dos antígenos IBMP foi utilizado separadamente como antígeno de captura. Em seguida, foram adicionados 100 µl da solução WellChampion™ (Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca; lote 130703) por cavidade, para sensibilização, bloqueio das microplacas e estabilização dos antígenos. Após incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, as microplacas foram esvaziadas por inversão e colocadas em estufa a 37° C por 20 minutos para secagem (Marconi[®] MA032, São Paulo, Brasil). Após estes procedimentos as microplacas encontravam-se prontas para uso.

4.4.2 Obtenção do *pool* sérico

Para a realização dos imunoenaios foi necessária a utilização de cinco controles negativos e cinco positivos. Estas amostras foram utilizadas para a construção da curva ROC e determinação do ponto de corte (*cut-off*). Cada *pool* foi constituído por 3 amostras positivas

ou negativas. Dois dos cinco controles positivos referem-se aos padrões biológicos da Organização Mundial da Saúde (1st WHO anti-*Trypanosoma cruzi* I and II Antibody Reference Panel, Version 6.0, NIBSC). Estas amostras são representativas de um doador de sangue proveniente da Cidade do México (TcI) e a outra de dois doadores de sangue provenientes de São Paulo e do Chile (TcII). Estes padrões foram constituídos pela OMS com o objetivo de uniformizar as avaliações de desempenho diagnóstico dos testes comerciais disponíveis no mundo. As alíquotas chegaram ao nosso laboratório na forma liofilizada e foram reconstituídas segundo as orientações contidas na bula do fabricante (NIBSC, 2004).

4.4.3 ELISA indireto

A presença de anticorpos anti-*T. cruzi* nas amostras séricas foi avaliada utilizando o ELISA indireto. Para esta finalidade, as amostras foram diluídas 100 vezes em tampão PBS pH 7.4 (fosfato de sódio 10 mM - Na₃PO₄ e cloreto de sódio 150 mM - NaCl) e adicionadas às cavidades das microplacas previamente sensibilizadas com os antígenos IBMP. Os ensaios foram planejados de modo que duas cavidades fossem utilizadas como controle negativo da placa (“branco da reação”), cinco para os *pools* das amostras positivas e cinco das amostras negativas, diluídos na mesma proporção (1:100). Em seguida, 100 µL das amostras séricas diluídas foram adicionadas a cada cavidade. As microplacas foram seladas e incubadas em estufa (Marconi[®] MA032, São Paulo, Brasil) a 37° C por 60 min. Ao final desta etapa, as microplacas foram lavadas cinco vezes com a adição de 250 µl da solução de lavagem (tampão PBS-Tween-20 a 0,05%, PBS-T) para retirada do material não adsorvido. Em seguida, foram adicionados a cada cavidade, 100 µl do anticorpo secundário diluído 40.000 vezes em PBS. Trata-se de uma anti-globulina humana (anti-IgG) conjugada à peroxidase. Este anticorpo (lote 167EXCJHPCC6Z) foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ-RJ) para a realização deste estudo. As microplacas foram novamente seladas e incubadas em estufa a 37° C por 30 min. Ao final da incubação, as microplacas foram novamente lavadas, conforme descrito anteriormente. Ao final do segundo ciclo de lavagem, foram adicionados a cada poço 100 µl da solução reveladora TMB Plus (Ken-Em-TecDiagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca; lote 111011). Posteriormente, as microplacas foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min na ausência de luz. Após a incubação, adicionou-se 50 µL da solução de parada (H₂SO₄ a 0,2M) e a leitura das densidades ópticas (DO) foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas (VersaMax, Molecular Devices, San Jose, EUA) a 450 nm.

4.5 EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.5.1 Definição do *cut-off* (CO)

Os pontos de corte foram calculados individualmente para cada microplaca utilizando cinco *pools* de amostras positivas e cinco negativas. Os valores das densidades ópticas obtidos foram exportados para o *software* GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., EUA). A partir disso, foi calculada a área abaixo da curva ROC (AUC – *área under* ROC) utilizando um intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para obtenção dos valores dos pontos de corte.

4.5.2 Normalização dos dados

A normalização dos dados foi realizada para evitar a variabilidade inerente a cada microplaca. Para isso, foi calculado o índice de reatividade (IR) para cada amostra, como descrito abaixo:

$$\text{Índice de reatividade (IR)} = \frac{\text{DO da Amostra}}{\text{Valor do CO}}$$

Foi considerada negativa toda amostra com IR inferior a 1,00 e positiva todas aquelas com IR igual ou superior a 1,00. Com o objetivo de evitar erros sistemáticos, foi estabelecido como critério de repetição todas as amostras com IR entre 0,80 e 1,20. A partir da obtenção dos valores do IR de cada amostra, os resultados foram representados em gráficos pelo GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., EUA).

4.5.3 Determinação dos parâmetros de desempenho

A avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos IBMP foi realizada através da utilização de parâmetros que descrevem o desempenho de um teste diagnóstico, como sensibilidade, especificidade, exatidão, valores preditivos, razões de verossimilhança, *odds ratio* diagnóstico e probabilidades pré e pós-teste, juntamente com seus intervalos de confiança a 95% (OUCHCHANE; RABILLOUD; BOIRE, 2009). Para isto, foram utilizadas

tabelas de dupla entrada (2x2) relacionando os resultados da análise de classe latente com o ELISA *in house* (figura 19).

		Padrão Ouro			
		Com doença	Sem doença		
Teste	Positivo	Verdadeiro Positivos VP	Falso Positivos FP	VP +	FP
	Negativo	Falso Negativos FN	Verdadeiro Negativos VN	FN +	VN
		VP + FN	FP + VN	VP+FP +	
				FN+VN	

Figura 19: Combinação binária entre os prováveis resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.

Fonte: Santos (2016).

Legenda: FN (falso negativo); FP (falso positivo); VN (verdadeiro negativo); VP (verdadeiro positivo).

A partir desta tabela alguns conceitos podem ser adotados e os parâmetros de desempenho determinados, a saber:

- Resultados verdadeiro-positivos (VP): amostras com resultado positivo no teste dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como positivo para a DC crônica;
- Resultados verdadeiro-negativos (VN): amostras com resultado negativo no teste dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como negativo para a DC crônica;
- Resultados falso-positivos (FP): amostras com resultado positivo no teste dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como negativo para a DC crônica;
- Resultados falso-negativos (FN): amostras com resultado negativo no teste dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como positivo para a DC crônica.

Quanto aos parâmetros de desempenho, os conceitos e fórmulas para obtenção dos valores estão descritos abaixo:

- Sensibilidade (Sen). Definida como a probabilidade que um indivíduo seja positivo no teste sabendo que ele tem a doença. Quanto mais próxima de 1 (ou 100%) estiver a sensibilidade, melhor será o desempenho de teste.

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

- Especificidade (Esp). Definida como a probabilidade que um indivíduo seja negativo no teste sabendo que ele não tem a doença. De forma similar à sensibilidade, quanto mais próxima de 1 estiver a especificidade, melhor será o desempenho do teste.

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

Os valores dos intervalos de confiança a 95% (IC95%) para a sensibilidade e especificidade foram calculados conforme as fórmulas abaixo:

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

NDo = número de doentes

NSa = número de sadios

- Acurácia (Acu). Representa a proporção de diagnósticos corretos, ou seja, são os resultados corretamente classificados (VP e VN) no universo de amostras analisadas. Também é conhecida como exatidão 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.

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

- Valor preditivo positivo (VPP). Definido como a probabilidade que um indivíduo seja realmente portador da DC crônica sabendo que seu resultado foi positivo no teste. É a

capacidade do teste de prever a presença da infecção. Quanto mais próxima de 1 estiver o VPP, melhor será o desempenho do teste.

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

- Valor predito negativo (VPN). Definido como a probabilidade que um indivíduo possui de não ser portador da DC crônica sabendo que seu resultado foi negativo no teste. É a capacidade do teste de prever a ausência da infecção. Quanto mais próxima de 1 estiver o VPN, melhor será o desempenho do teste.

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

- Razões de verossimilhança (RV). Também conhecidos como coeficientes de probabilidade ou *Likelihood Ratios*, em inglês. Estes parâmetros permitem mensurar informações precisas de um novo teste, os quais reúnem em um único estimador os valores de Sen e Esp, constituindo uma medida global de poder discriminatório de um teste diagnóstico. No presente estudo, as RV foram determinadas com o objetivo de verificar se os resultados obtidos com a utilização dos antígenos IBMP aumentam ou diminuem a probabilidade de diagnosticar laboratorialmente a DC (OLIVEIRA *et al.*, 2010). 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 não será útil se $RV=1$ (ou se o IC95% inclui-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 4, 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 4. Interpretação dos valores das razões de verossimilhança

Resultados possíveis	Interpretação
$RV > 10$	Aumento significativo da probabilidade
$5 < RV \leq 10$	Aumento moderado da probabilidade
$2 < RV \leq 5$	Aumento pequeno da probabilidade
$1 < RV \leq 2$	Aumento insignificante da probabilidade
$RV = 1$	Sem significado estatístico
$0,5 < RV < 1$	Diminuição insignificante da probabilidade
$0,2 < RV \leq 0,5$	Diminuição pequena da probabilidade
$0,1 < RV \leq 0,2$	Diminuição moderada da probabilidade
$RV \leq 0,1$	Diminuição significativa da probabilidade

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

Legenda: RV (razão de verossimilhança).

Assim, 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 (OUCHCHANE; RABILLOUD; BOIRE, 2009):

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

- *Odds ratio* diagnóstico (ORD). Este parâmetro é também conhecido como razão de chances de diagnóstico. É definido como a razão entre a probabilidade do teste ser positivo se o sujeito é portador da DC crônica em relação a probabilidades do teste ser positivo se o sujeito não for portador. Os valores de ORD variam de zero a infinito. Todavia, os testes só são úteis se os valores forem maiores que 1. Quanto mais elevados os valores de ORD, melhor o desempenho do teste.

$$ORD = \frac{RV +}{RV -}$$

- Probabilidades pré e pós-teste. A probabilidade pré-teste é definida como a probabilidade estimada do indivíduo ser portador da DC crônica antes da realização do teste. A probabilidade pré-teste é igual à prevalência da doença na população estudada. Já a probabilidade pós-teste é a probabilidade do indivíduo ser portador da DC crônica após da realização do teste. Esta última pode ser estratificada em probabilidade pós-teste positiva ou negativa. A probabilidade pós-teste positiva é definida como a probabilidade do indivíduo ser portador da DC crônica caso o resultado do teste for positivo. Por outro lado, a probabilidade pós-teste negativa é definida como a probabilidade do indivíduo ser portador da DC crônica caso o resultado do teste seja negativo. Quanto mais próxima de 1 estiver a probabilidade pós-teste positiva e mais próxima de zero estiver a probabilidade pós-teste negativa, melhor será o desempenho do teste. As probabilidades pós-teste positiva e negativa foram determinadas com auxílio do nomograma de Fagan, enquanto a probabilidade pré-teste foi calculada conforme a fórmula abaixo (AKOBENG, 2007):

$$\text{Probabilidade pré - teste} = \frac{VP + FN}{VP + FP + FN + VN}$$

- Área abaixo da curva ROC (AUC). Este parâmetro é estimado após a construção de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*), a qual é traçada utilizando a taxa de resultados verdadeiro-positivos contra a taxa dos resultados falso-positivos. A partir desta determinação gráfica, a área abaixo da curva é calculada, podendo o seu valor variar de 0 a 1. Os testes diagnósticos apresentam utilidade quando os valores são acima de 0,50. Valores de AUC abaixo de 0,50 indicam que o teste não tem capacidade discriminatória entre os indivíduos positivos ou negativos para a DC crônica. A construção das curvas ROC e determinação dos valores de AUC foram realizados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., EUA). A interpretação dos valores de AUC estão descritos no Quadro 5 (SWETS, 1988).

Quadro 5. Interpretação dos valores de AUC

Resultados possíveis	Interpretação
$AUC \leq 0,50$	Teste sem valor diagnóstico
$0,51 \leq AUC \leq 0,61$	Poder discriminatório baixo
$0,62 \leq AUC \leq 0,81$	Poder discriminatório moderado
$0,82 \leq AUC \leq 0,99$	Poder discriminatório elevado
$AUC = 1,00$	Poder discriminatório perfeito

Legenda: AUC (área abaixo da curva ROC).

Fonte: Modificado de Swets (1988).

4.5.4 Testes estatísticos

A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de medidas descritivas como: média geométrica, desvio padrão e coeficiente de variação. As médias geométricas foram calculadas com os seus respectivos intervalos de confiança (IC95%). Para testar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. Quando da rejeição da hipótese nula, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. No caso de confirmação da normalidade dos dados foi utilizado o teste T de Student. 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 8 (GraphPad Software Inc., EUA) para realização dos testes estatísticos.

4.5.5 Análise de classe latente

Na ausência de um teste padrão-ouro, a análise de classe latente (LCA) é sugerida como um método para a obtenção dos parâmetros de desempenho de um teste diagnóstico (SANTOS *et al.*, 2018). A LCA pressupõe que, embora a presença da doença permaneça desconhecida, os métodos de avaliação disponíveis oferecem uma aproximação do estado real da doença sendo, desta forma, capaz de fornecer uma estimativa da presença ou ausência da doença. Uma vez que inexistente um teste de referência para diagnosticar a DC crônica, a OMS recomenda a realização de dois testes comerciais em paralelo. A concordância entre eles define o estado sorológico do paciente. No entanto, falhas na precisão diagnóstica destes testes podem levar a resultados errôneos (os testes comerciais não são perfeitos!). Por este motivo, adotamos a LCA como teste de referência em nosso estudo (figura 20). Através desta

ferramenta, as amostras foram classificadas como negativas ou positivas. Este modelo de análise já foi validado em estudos anteriores (SANTOS *et al.*, 2018; DALTRO *et al.*, 2019).

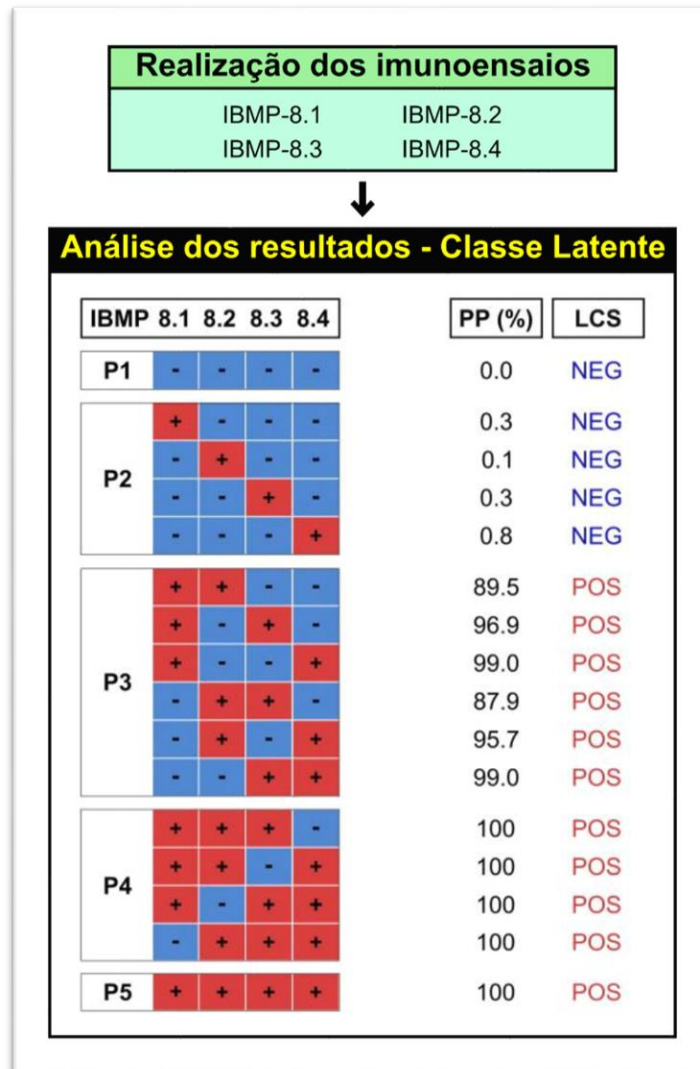


Figura 20: Análise de classe latente (LCA) utilizado para caracterização do perfil sorológico do painel amostral inscrito no estudo.

Legenda: N (negativo), P (padrão), PP (probabilidade à posteriori), LCS (padrão de classe latente), POS (positivo).

Fonte: Modificado de Santos *et al.*, 2018.

4.5.6 Mapas temáticos

Métodos de análise espacial e técnicas de sistema de informação geográfica foram usados para avaliar a origem geográfica dos doadores da Bahia e do Brasil. Os mapas digitais foram obtidos a partir da base cartográfica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no formato *shape file* (.shp), o qual é compatível com o Software Terra View, versão 5.5.1,

desenvolvido pela Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Este pacote de software foi usado para o processamento, análise e apresentação de dados cartográficos.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ANTÍGENOS

A análise eletroforética dos antígenos IBMP mostrou a presença de bandas distintas e bem conservadas para as quatro moléculas, bem como ausência de contaminantes (Figura 21).

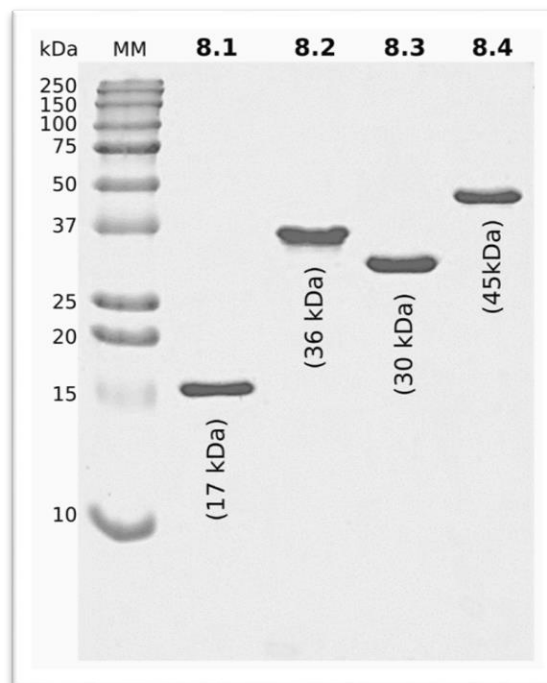


Figura 21: SDS-PAGE dos antígenos IBMP corados pelo azul de Coomassie.

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).

Nota: Adicionado 1 μ g de antígeno/poço.

Fonte: A autora.

5.2 DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL

Segundo o cálculo de dimensionamento amostral, o programa R estimou um total de 4.754 amostras a serem utilizadas neste estudo. As coletas foram realizadas uma ou duas vezes ao mês entre dezembro de 2018 e agosto de 2019. O quantitativo de coletas ao mês dependeu da disponibilidade do setor de sorologia do HEMOBA em separar o material para ser

encaminhado ao LASP. Considerando o critério de exclusão definido anteriormente e possíveis perdas, foi estimado um quantitativo de 5% a mais de amostras a serem inscritas no estudo. Desta forma, 5.014 amostras foram coletadas, alíquotadas e armazenadas a -20°C no LASP até a realização dos testes sorológicos. Do total de amostras coletadas, 2.144 (42,76%) foram provenientes de doadores do sexo feminino e 2.844 (56,72%) do sexo masculino. Quanto a origem dos doadores, foi observado que 4.909 foram oriundos de 232 municípios da Bahia. Ressalta-se que todas as microrregiões baianas se encontram representadas neste universo amostral com, ao menos, 1 doador (Figura 22).

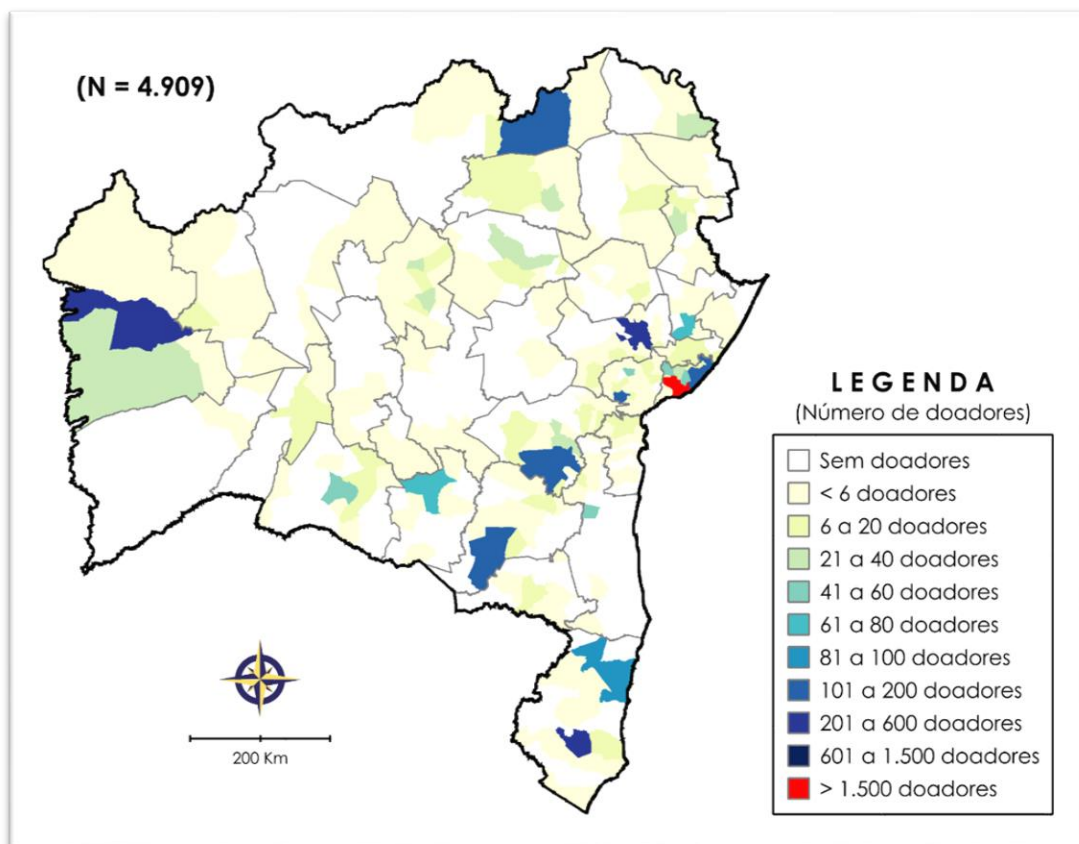


Figura 22: Distribuição geográfica, segundo município e microrregião, dos doadores oriundos do estado da Bahia (n = 4.909).

Fonte: A autora.

Todavia, 79 doadores foram oriundos de outros estados brasileiros ou do Distrito Federal, a saber: Alagoas (n = 1), Distrito Federal (n = 2), Espírito Santo (n = 2), Goiás (n = 2), Minas Gerais (n = 5), Pernambuco (n = 57), Paraná (n = 1), Rio de Janeiro (n = 1), Rio Grande do Norte (n = 1), Rio Grande do Sul (n = 3) e São Paulo (n = 4). A distribuição dos doadores por cidades encontra-se descrita na figura 23. Dados sobre sexo e origem de 26 doadores não foram disponibilizados pelo HEMOBA.

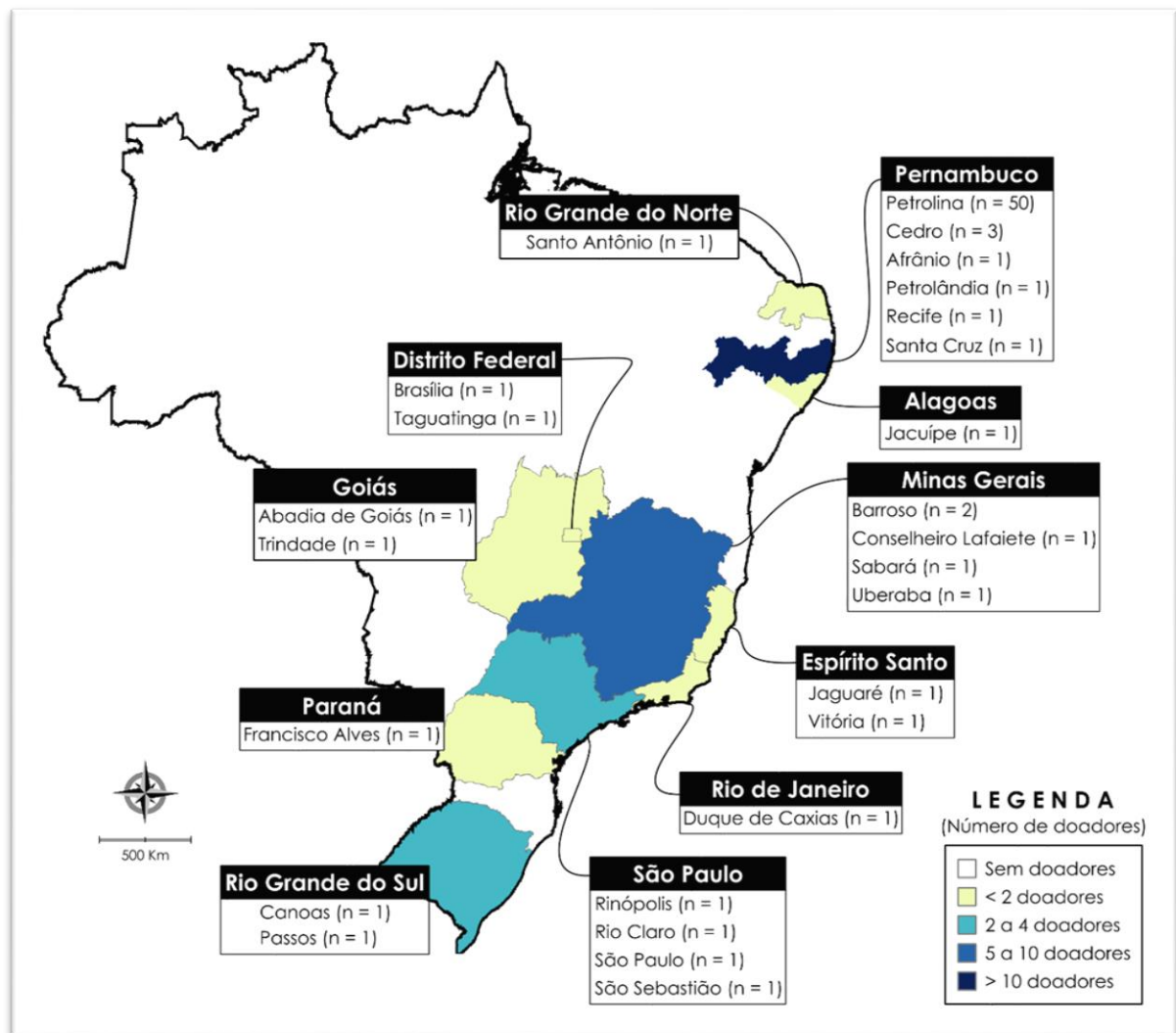


Figura 23: Distribuição geográfica, segundo município, dos doadores oriundos de outros estados brasileiros ($n = 79$), exceto a Bahia.

Fonte: A autora.

O perfil sorológico dos 5.014 doadores também foi considerado neste estudo. A figura 24 demonstra que, sorologicamente, 4.483 (89,41%) amostras foram classificadas pelo HEMOBA como negativas para os marcadores anti-Hbc, DC, HBsAg, HBV, HCV, HIV, HTLV e sífilis. Contudo, 234 (4,67%) bolsas foram descartadas por apresentarem positividade para anti-Hbc, 157 (3,13%) para sífilis, 40 (0,80%) para HTLV, 38 (0,76%) para DC, 20 (0,40%) para HIV, 16 (0,32%) para HCV e 12 (0,24%) para HBsAg. Nenhuma amostra apresentou reatividade isolada ao HBV. Coinfecção foi relatada em 14 (0,28%) amostras, sendo mais frequente a positividade para anti-Hbc combinada à sífilis ($n = 4$). Outras coinfeções foram verificadas para anti-Hbc e HBsAg ($n = 2$), anti-Hbc e HBV ($n = 2$), HBsAg e HBV ($n = 1$), HCV e sífilis ($n = 1$), HTLV e sífilis ($n = 1$), anti-Hbc e HTLV ($n = 1$).

= 1), HIV e sífilis (n = 1) e, por fim, a tripla positividade para anti-Hbc, HTLV e sífilis (n = 1). Não foi observada coinfeção pelo *T. cruzi* e outros agentes infecciosos.

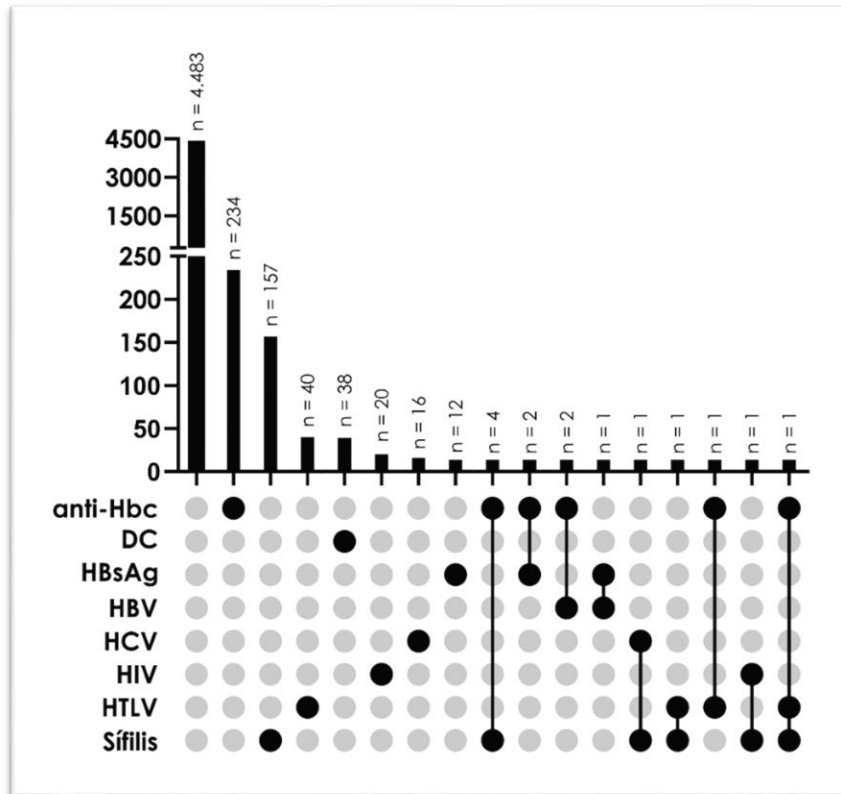


Figura 24: Perfil sorológico das amostras inscritas neste estudo (n = 5.014) coletadas no período de dezembro de 2018 a agosto de 2019. Triagem realizada no setor de sorologia da Fundação HEMOBA.

Nota: Círculos em cinza representam resultados não positivos, enquanto os círculos pretos representam não negatividade na triagem sorológica.

Fonte: A autora.

A tabela 1 mostra as características sociodemográficas dos doadores classificados como positivos para DC pelo HEMOBA. Das 38 amostras positivas para DC, 6 apresentam índice de reatividade inferior a 1,00 no teste de triagem (LIAISON[®] XL Murex Chagas, DiaSorin, Saluggia-VC, Itália). O HEMOBA considera como ponto de corte para descarte de bolsa, amostras com índice de reatividade igual ou superior a 0,75. Este fato visa a segurança do material biológico, visto que a redução do ponto de corte elimina possíveis bolsas com resultado falso-negativo no teste de triagem.

Tabela 1 – Características sociodemográficas e índices de reatividade no teste de triagem dos doadores com resultado positivo para a DC triados no HEMOBA entre dezembro de 2018 e agosto de 2019.

Identificação	Sexo	Idade	Município de origem	IR	RES
HMB-4096	Masculino	34	Salvador	0,92	Pos
HMB-4097	Masculino	27	Vitória da Conquista	1,40	Pos
HMB-4101	Masculino	42	Salvador	1,10	Pos
HMB-4159	Masculino	43	Serra Dourada	1,20	Pos
HMB-4160	Masculino	49	Barreiras	12,0	Pos
HMB-4465	Feminino	40	Canarana	13,0	Pos
HMB-5223	Masculino	20	Salvador	1,40	Pos
HMB-5240	Masculino	41	Sítio do Quinto	1,70	Pos
HMB-5250	Feminino	32	Teixeira de Freitas	1,10	Pos
HMB-5608	Masculino	46	Barreiras	0,95	Pos
HMB-5618	Masculino	39	São Desidério	6,10	Pos
HMB-5619	Feminino	41	Barreiras	1,40	Pos
HMB-5620	Masculino	45	São Desidério	8,10	Pos
HMB-5892	Masculino	22	Salvador	1,10	Pos
HMB-5900	Masculino	29	Salvador	14,00	Pos
HMB-5901	Masculino	50	São Felipe	16,00	Pos
HMB-5917	Masculino	41	Cotegipe	12,00	Pos
HMB-5918	Feminino	43	Feira de Santana	8,00	Pos
HMB-5924	Feminino	28	Santo Antônio de Jesus	1,60	Pos
HMB-6797	Feminino	30	Cruz das Almas	14,00	Pos
HMB-6802	Masculino	37	Cristópolis	13,00	Pos
HMB-6812	Feminino	22	Jacobina	1,10	Pos
HMB-6827	Masculino	41	Salvador	13,00	Pos
HMB-6840	Masculino	51	Salvador	17,00	Pos
HMB-6856	Masculino	51	Barreiras	13,00	Pos
HMB-6872	Feminino	44	Porto Seguro	1,40	Pos
HMB-6920	Feminino	63	Santa Terezinha	10,00	Pos
HMB-6979	Feminino	33	Simões Filho	1,20	Pos
HMB-6995	Masculino	30	Salvador	1,00	Pos
HMB-7013	Masculino	30	Salvador	5,60	Pos
HMB-7017	Feminino	42	Salvador	4,00	Pos
HMB-7032	Feminino	58	Simões Filho	0,94	Pos
HMB-7046	Feminino	27	Salvador	0,98	Pos
HMB-7053	Masculino	46	Jacobina	0,85	Pos
HMB-7076	Feminino	22	Salvador	1,00	Pos
HMB-7086	Masculino	22	Guanambi	2,40	Pos
HMB-7087	Feminino	59	Brumado	16,00	Pos
HMB-7105	Masculino	54	Luís Eduardo Magalhães	0,97	Pos

Nota: Células em laranja indicam as amostras consideradas positivas para a DC ($IR \geq 1,00$). Células em verde indicam bolsas descartadas por critério adotados pelo HEMOBA ($0,75 \leq IR < 1,00$).

Legenda: HMB (HEMOBA); IR (Índice de reatividade); RES (Resultado).

Fonte: A autora.

5.3 ANÁLISE DE CLASSE LATENTE (LCA)

As amostras foram processadas pelo método do ELISA indireto *in-house* utilizando os quatro antígenos quiméricos. Após este procedimento, a LCA foi aplicada para definição do perfil sorológico das amostras. Das 5.014 amostras, 21 (0,42%) foram classificadas como positivas para a DC. Deste quantitativo, 18 amostras (85,7%) foram positivas para todas as moléculas IBMP, com probabilidade a posteriori de 100% do resultado estar correto. As três amostras restantes (14,3%) apresentaram reatividade para duas moléculas, duas delas para as moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4 e uma para as moléculas IBMP-8.2 e IBMP-8.4, com probabilidade à posteriori de 99% e 95,7%, respectivamente. Os dados epidemiológicos e índices de reatividade destas 21 amostras estão representados na tabela 2. Das 32 amostras com IR igual ou superior a 1,00 no teste de triagem do HEMOBA (CLIA; LIAISON® XL Murex Chagas, DiaSorin, Saluggia-VC, Itália), 16 foram classificadas como positivas na análise de classe latente e 16 apresentaram resultado negativo. Destas últimas, somente uma amostra apresentou positividade isolada para a molécula IBMP-8.3, com probabilidade de 0,3% desta amostra ser realmente positiva na LCA. As seis bolsas com $0,75 \leq \text{IR} < 1,00$ no teste de triagem do HEMOBA (Tabela 1) foram classificadas como negativas pela LCA, sem reatividade para nenhuma das moléculas IBMP. Interessantemente, cinco amostras classificadas como negativas pelo HEMOBA foram positivas pela LCA, sendo quatro delas reativas para todas as moléculas IBMP e uma delas para as moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4 (99% de probabilidade à posteriori).

Tabela 2 – Classificação das amostras como positivas para a DC utilizando a análise de classe latente como teste de referência.

Id HMB-	Sexo	Idade	Município de origem	Índice de reatividade (IR)				LCA	IR CLIA
				8.1	8.2	8.3	8.4		
3028	Mas	52	Iraquara	0,61	0,58	2,12	1,42	Pos	Neg
3295	Fem	23	Jaguaquara	1,46	1,38	1,22	1,93	Pos	Neg
4097	Mas	27	Vitória da Conquista	0,32	0,29	1,99	2,60	Pos	Pos
4160	Mas	49	Barreiras	1,74	1,84	1,33	1,44	Pos	Pos
4465	Fem	40	Canarana	2,34	2,75	2,68	2,86	Pos	Pos
5231	Mas	47	Barreiras	1,56	2,82	2,69	2,38	Pos	Neg
5617	Fem	28	Salvador	1,59	2,78	2,21	2,20	Pos	Neg
5618	Mas	39	São Desidério	0,44	1,14	0,79	1,15	Pos	Pos
5900	Mas	29	Salvador	2,22	2,32	2,41	1,91	Pos	Pos
5901	Mas	50	São Felipe	2,55	2,65	2,93	2,46	Pos	Pos
5917	Mas	41	Cotegipe	1,97	2,36	2,10	1,61	Pos	Pos
5918	Fem	43	Feira de Santana	1,88	1,91	1,59	1,98	Pos	Pos
5936	Fem	NR	Barroso	1,69	1,29	1,14	1,81	Pos	Neg
6797	Fem	30	Cruz das Almas	2,67	2,87	2,58	2,20	Pos	Pos
6802	Mas	37	Cristópolis	1,54	1,41	2,00	1,31	Pos	Pos
6827	Mas	41	Salvador	2,40	2,21	2,52	2,31	Pos	Pos
6840	Mas	51	Salvador	3,35	3,71	2,80	2,68	Pos	Pos
6856	Mas	51	Barreiras	2,73	2,48	2,02	2,33	Pos	Pos
6920	Fem	63	Santa Terezinha	2,89	1,93	3,24	2,67	Pos	Pos
7013	Mas	30	Salvador	1,92	1,83	1,70	1,95	Pos	Pos
7087	Fem	59	Brumado	2,28	2,21	1,58	2,07	Pos	Pos

Nota: Células em laranja indicam as amostras positivas para a DC; Células em verde indicam amostras negativas para a DC.

Legenda: CLIA (Quimiluminescência; teste de triagem do HEMONA); Fem (Feminino); HMB (HEMOBA); Id (Identificação); IR (Índice de reatividade); Mas (Masculino); Neg (Negativo); NR (Não reportado); Pos (Positivo).

Fonte: A autora.

5.4 PARÂMETROS DIAGNÓSTICOS COM ANTÍGENOS ISOLADOS

Após definição do perfil sorológico para a DC utilizando a LCA como teste de referência, os parâmetros de desempenho dos antígenos quiméricos foram calculados para cada um deles. Inicialmente foram geradas curvas ROC para determinação dos valores de AUC (figura 25), sendo encontrados os valores de 99,31%, 98,68%, 99,99% e 100% para os antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4, respectivamente.

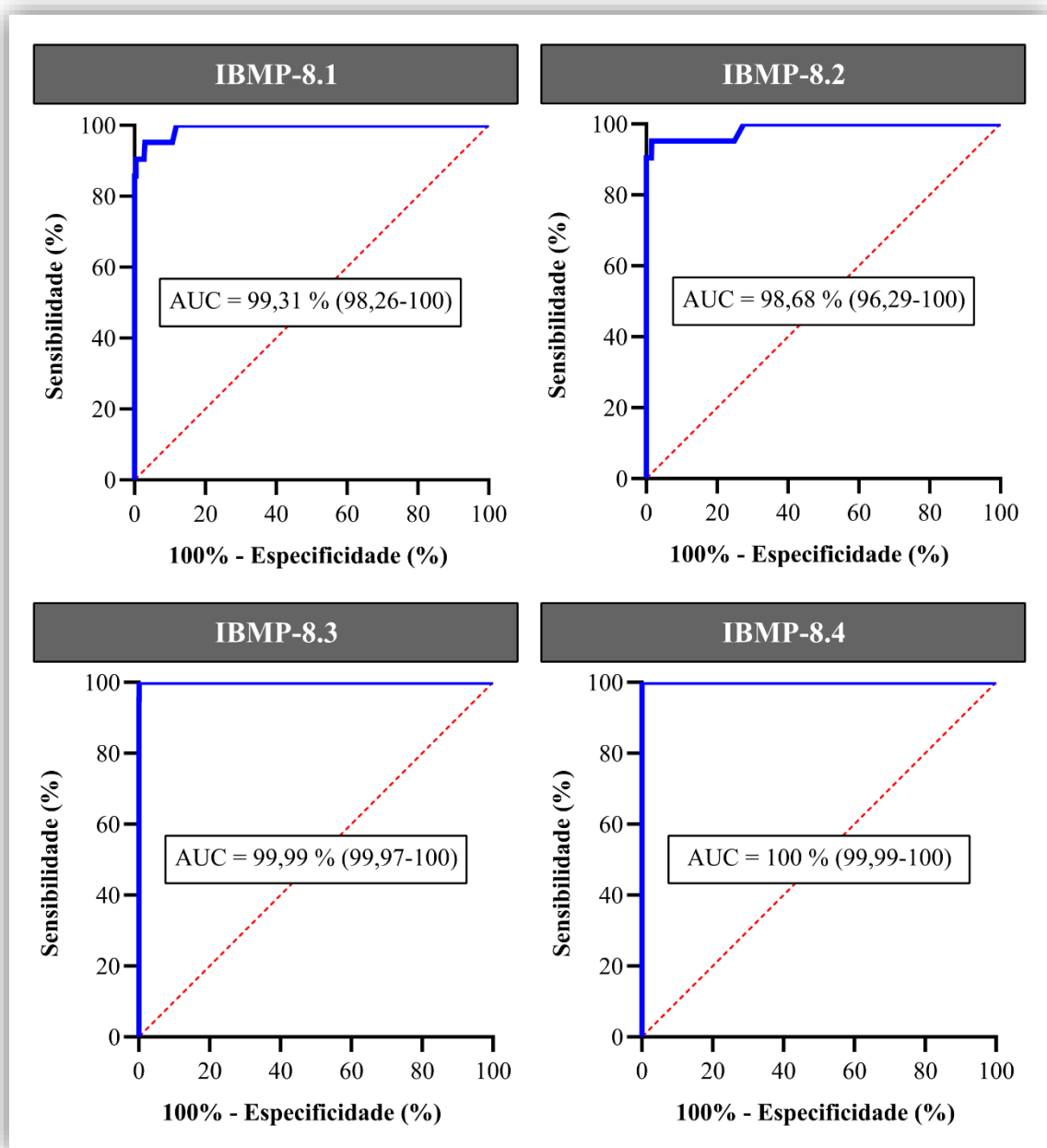


Figura 25: Gráficos das curvas ROC e valores de AUC dos antígenos IBMP utilizando a análise de classe latente como teste de referência.

Fonte: A autora.

A análise dos índices de reatividade mostrou que o IR médio das amostras positivas difere significativamente daquele obtido para as amostras negativas (figura 26) para todos os antígenos ($p < 0,0001$). Para as amostras positivas, os sinais variaram de 1,68 a 2,00, não havendo diferença significativa entre eles. Quanto às amostras negativas, os valores foram de 0,16 para as moléculas IBMP-8.1 e IBMP-8.3, 0,19 para o antígeno IBMP-8.4 e 0,21 para a molécula IBMP-8.3.

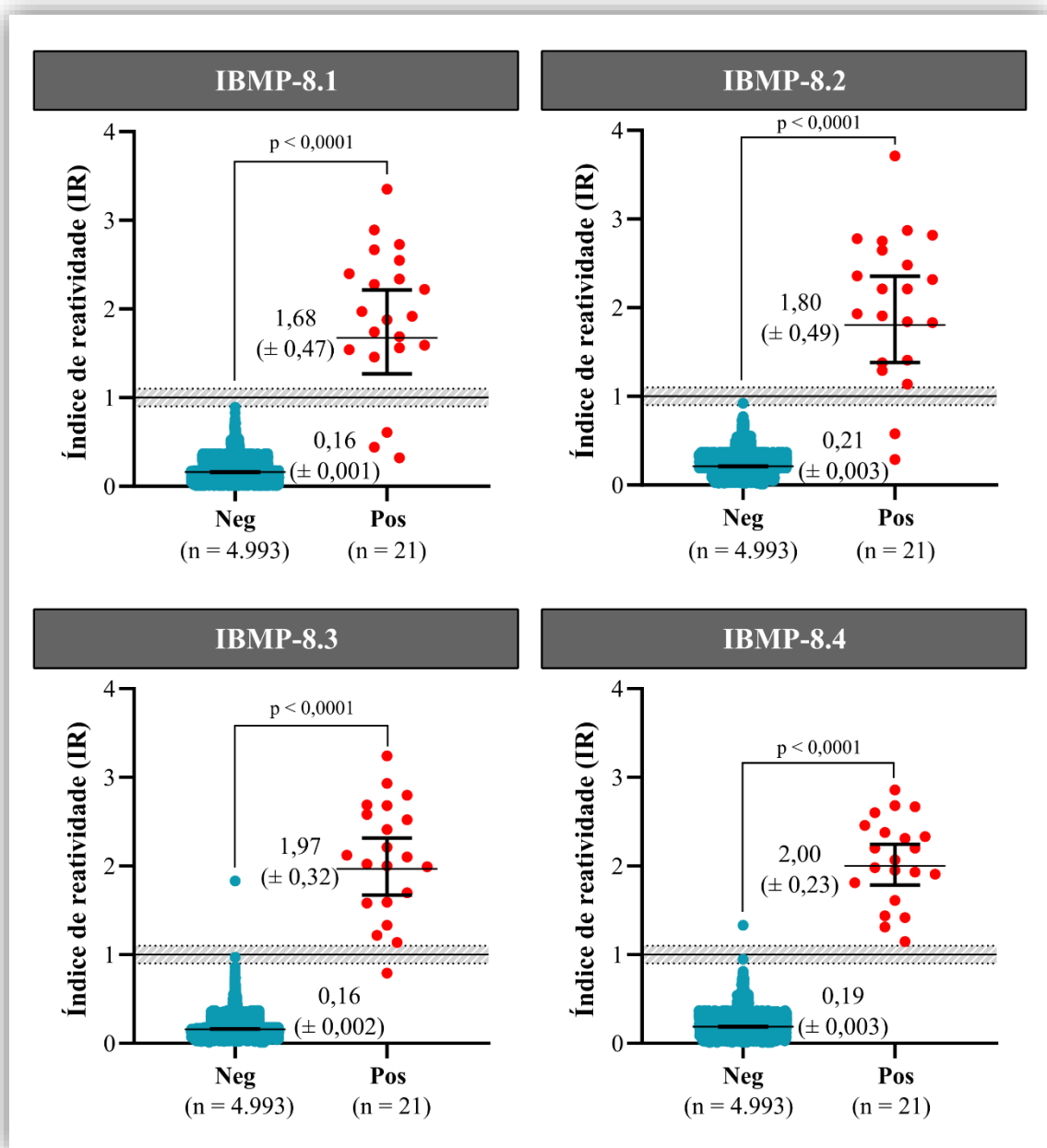


Figura 26: Análise gráfica dos índices de reatividade dos antígenos IBMP na fase III do estudo.

Nota: Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ($IR \pm 10\%$). Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Legenda: Neg (amostras negativas); Pos (amostras positivas).

Fonte: A autora.

Os parâmetros de desempenho foram obtidos individualmente para cada antígeno e encontram-se descritos na Tabela 3. A sensibilidade exibiu valores de 85,71%, 90,48%, 95,24% e 100% para o IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4, respectivamente. No entanto, no que diz respeito à especificidade os antígenos apresentaram valores de 99,98% (IBMP-8.3 e IBMP-8.4) e 100% (IBMP-8.1 e IBMP-8.2). As moléculas IBMP-8.1, IBMP-8.2

e IBMP-8.3 apresentaram três, duas e uma amostra falso-negativa, respectivamente (Figura 26). Os valores de acurácia foram similares a todos os antígenos (> 99,9%), não havendo diferença entre eles.

Tabela 3. Parâmetros de desempenho dos antígenos IBMP estratificados na fase III do estudo.

Parâmetros de desempenho	IBMP-8.1	IBMP-8.2	IBMP-8.3	IBMP-8.4
Sen (%)	85,71 (65,36-95,02)	90,48 (71,09-97,35)	95,24 (77,33-99,15)	100 (84,54-100)
Esp (%)	100 (99,92-100)	100 (99,92-100)	99,98 (99,89-100)	99,98 (99,89-100)
Acc (%)	99,94 (99,82-99,98)	99,96 (99,85-99,99)	99,96 (99,85-99,99)	99,98 (99,89-100)
VPP (%)	100 (82,41-100)	100 (83,18-100)	95,24 (77,33-99,15)	95,45 (78,20-99,19)
VPN (%)	99,94 (99,82-99,98)	99,96 (99,85-99,99)	99,98 (99,89-100)	100 (99,92-100)
RV+	427.803	451.557	4.755	4.941
RV-	0,1432	0,0960	0,0480	0,0005
<i>Odds Ratio</i> diagnóstico	2.987.511	4.722.244	99.840	10.483.200
PPT (%)	0,42	0,42	0,42	0,42
PPT + (%)	99,94 (82,34-100)	99,95 (83,11-100)	95,24 (77,34-99,16)	95,45 (78,20-99,19)
PPT - (%)	0,0006 (0,0002-0,0018)	0,0004 (0,0001-0,0015)	0,0002 (0-0,0011)	0,00001 (0-0,0008)

Fonte: A autora.

Legenda: Acc (acurácia); Esp (especificidade); Exa (exatidão); PFN (proporção de falso-negativos); PFP (proporção de falso-positivos); PPT (Probabilidade pré-teste); PPT+ (Probabilidade Pós-Teste Positiva), PPT- (Probabilidade Pós-Teste Negativa); RV+ (Razão de verossimilhança positiva); RV- (Razão de verossimilhança negativa); Sen (sensibilidade); VPP (Valor Preditivo Positivo); VPN (Valor Preditivo Negativo).

Por se tratar de um estudo prospectivo (fase III), foi possível determinar dois parâmetros de desempenho, os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN). O VPP foi de 100% para os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.2, 95,24% para o IBMP-8.3 e 95,45% para o IBMP-8.4. Enquanto o VPN superior a 99,94% para todos os antígenos, sendo de 100% para o IBMP-8.4.

Para uma melhor compreensão da probabilidade dos antígenos IBMP em diagnosticar a DC, as razões de verossimilhança positiva (RV+) e negativa (RV-) foram calculadas. Os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.2 apresentaram as maiores probabilidades em diagnosticar a DC, com RV+ estimada de 427.803 e 451.557, respectivamente. Em contrapartida, as moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4 apresentaram RV+ de 4.755 e 4.941. Em relação às bolsas negativas, a RV- do antígeno IBMP-8.4 foi de 0,0005, seguida pelo IBMP-8.3 (RV- = 0,0480), IBMP-8.2 (RV- = 0,0960) e IBMP-8.1 (RV- = 0,1432). Os valores de *Odds Ratio*

diagnóstico foram determinados através da relação $RV+/RV-$. Desta forma, o *Odds Ratio* diagnóstico dos antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 corresponderam a 2.9875.511, 4.722.2440, 99.840 e 10.483.200, respectivamente.

A probabilidade pré-teste foi de 0,42% para todas as quatro moléculas. Este resultado indica a prevalência da DC crônica na população estudada. Quanto à probabilidade pós-teste, os valores foram determinados tanto para as bolsas classificadas como negativas quanto aquelas classificadas como positivas pela análise de classe latente. Desta forma, a probabilidade pós-teste positiva apresentou valores de 99,94% para a molécula IBMP-8.1, 99,95% para a IBMP-8.2, 95,45% para a IBMP-8.4 e 95,24% para a IBMP-8.3. Quanto à probabilidade pós-teste negativa, os valores foram de 0,0006 para o antígeno IBMP-8.1, 0,0004 para o IBMP-8.2, 0,0002 para o IBMP-8.3 e 0,00001 para o IBMP-8.4. Para melhor visualização os resultados, os valores das probabilidades pré e pós-teste estão ilustrados no nomograma de Fagan (figura 27).

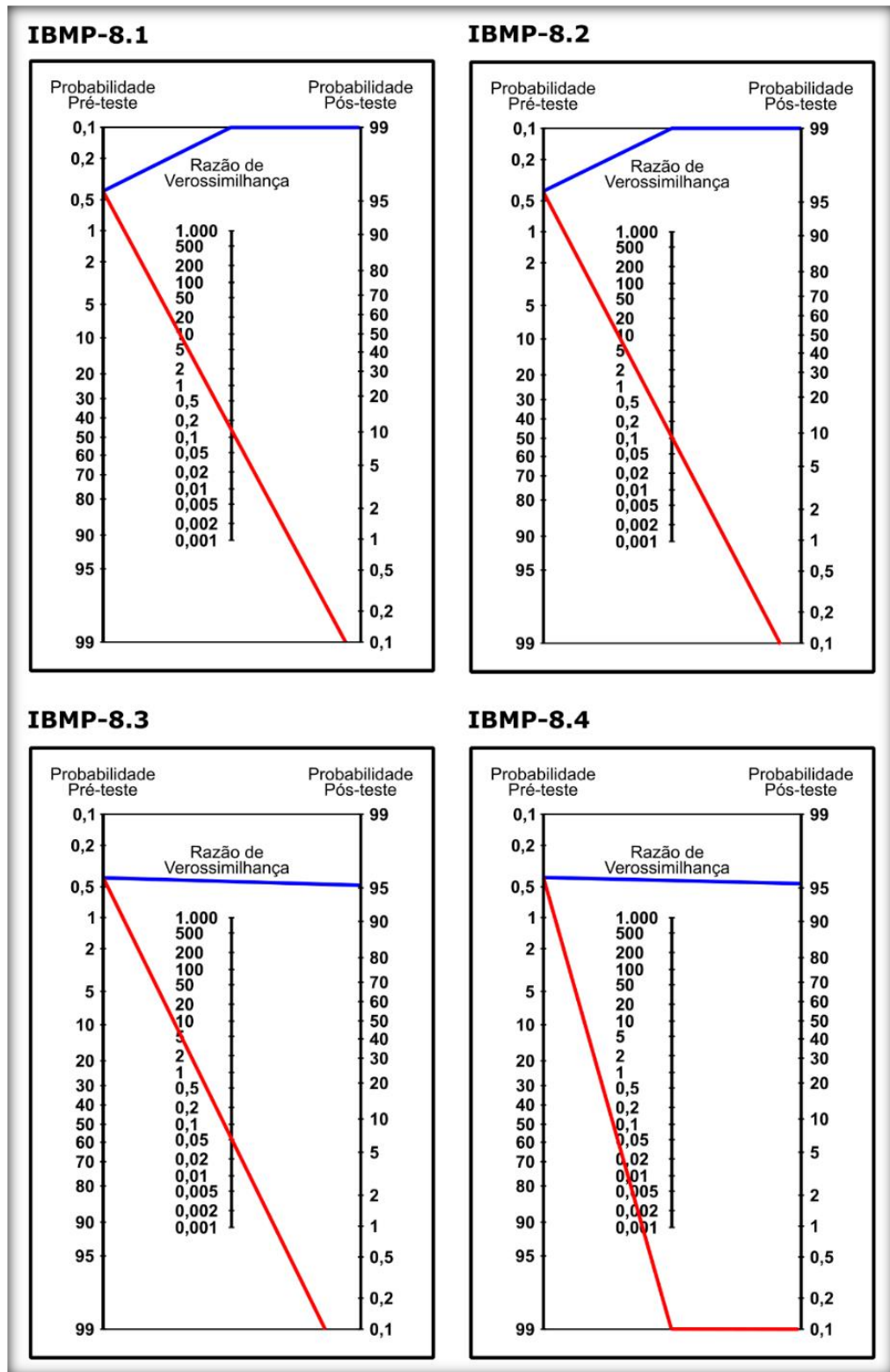


Figura 27: Análise gráfica dos valores das probabilidades pré e pós-teste através de nomogramas de Fagan.

Legenda: Linhas em azul representam a razão de verossimilhança positiva; Linhas em vermelho representam a razão de verossimilhança negativa.

Fonte: A autora.

5.5 ANÁLISE DE COINFECÇÃO E REATIVIDADE CRUZADA

Do total de amostras positivas para a DC utilizando a LCA como teste de referência, seis (28,6%) foram classificadas como não negativas para outras infecções nos testes de triagem realizados no HEMOBA: duas foram não negativas para HTLV, duas para sífilis, uma para anti-Hbc e uma para HCV + sífilis (Tabela 4). Conforme descrito na Tabela 2, todas estas amostras apresentaram sinal de IR acima de 1,00 para os quatro antígenos IBMP.

Tabela 4 – Coinfecção entre DC e outras doenças infecciosas triadas no HEMOBA como não negativas.

Identificação	LCA para DC	Marcadores sorológicos
		Triagem HEMOBA
HMB-5900	Pos	HTLV
HMB-5936	Pos	HTLV
HMB-5231	Pos	Sífilis
HMB-5617	Pos	Sífilis
HMB-6856	Pos	Anti-Hbc
HMB-5918	Pos	HCV + Sífilis

Nota: A positividade para a DC foi definida pela análise de classe latente.

Legenda: DC (DC); HMB (HEMOBA); LCA (Análise de Classe Latente).

Fonte: A autora.

Para a análise da reatividade cruzada, as amostras positivas para DC pela LCA foram desconsideradas. Desta forma, dentre as amostras negativas ($n = 4.993$), a triagem realizada pela Fundação HEMOBA classificou 233 como não negativas para o anti-Hbc, 150 para sífilis, 37 para HTLV, 20 para HIV, 15 para HCV, 12 para HBsAg e 13 para infecções mistas (4 anti-Hbc/sífilis; 2 amostras anti-Hbc/HBsAg; 2 anti-Hbc/HBV; 1 HBsAg/ HBV; 1 HTLV/sífilis; 1 anti-Hbc/HTLV; 1 HIV/sífilis; 1 HCV/sífilis; e 1 HTLV/anti-Hbc/sífilis). Conforme descrito na figura 28, nenhuma amostra apresentou reatividade cruzada ($IR \geq 1,00$) para nenhum dos quatro antígenos IBMP. Foi observado que somente duas amostras não negativas para anti-Hbc foram consideradas inconclusivas quando analisadas pelas moléculas IBMP-8.2 ($IR = 0,92$) e IBMP-8.4 ($IR = 0,95$). Contudo, estas amostras foram oriundas de doadores distintos.

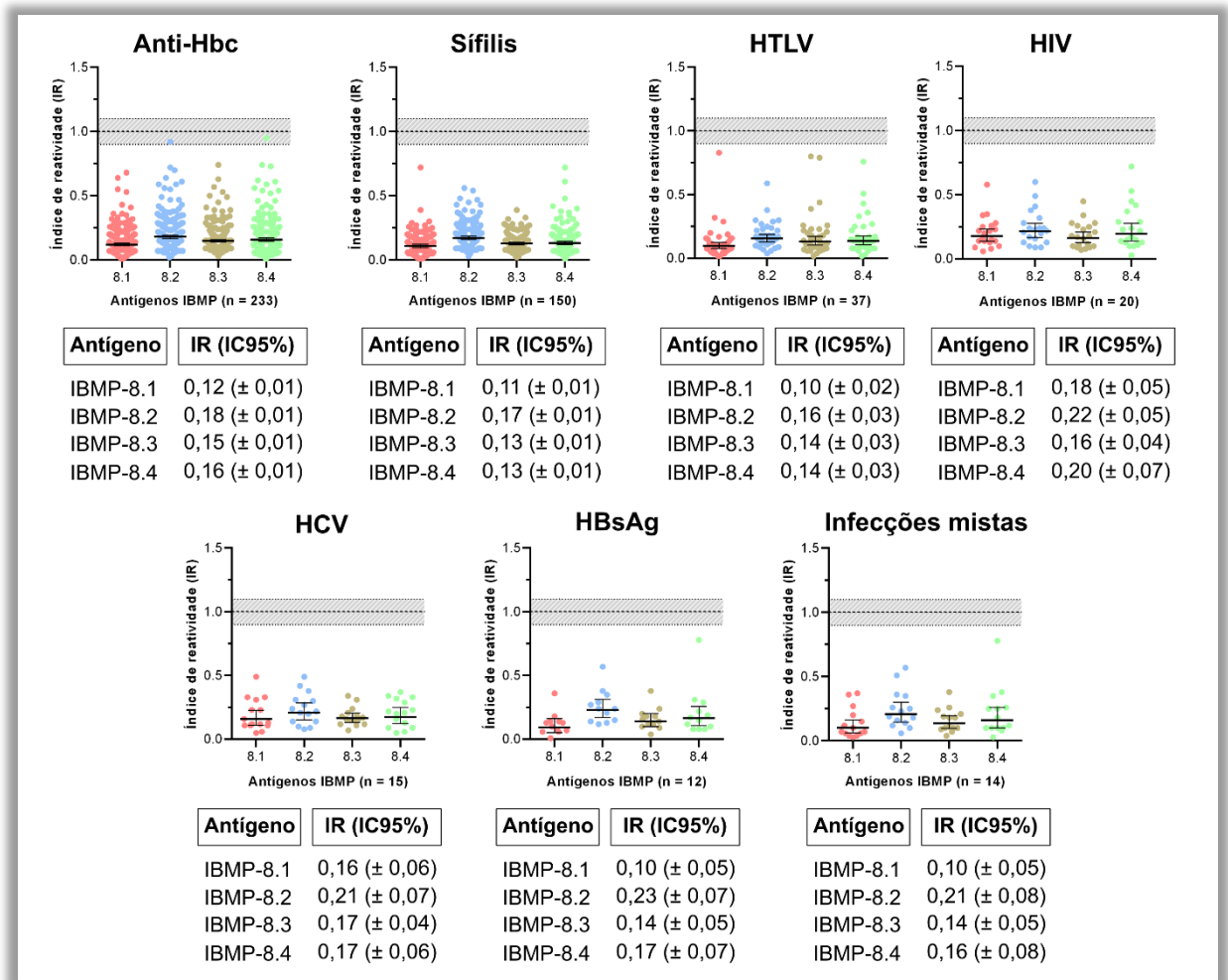


Figura 28: Análise gráfica da reatividade cruzada aos antígenos IBMP utilizando amostras não negativas triadas pela Fundação HEMOBA.

Legenda: IC95% (Intervalo de Confiança a 95%); IR (Índice de reatividade)

Fonte: A autora.

5.6 ANÁLISE DO USO DOS ANTÍGENOS IBMP NA TRIAGEM SOROLÓGICA PARA A DC

Um fator importante analisado neste estudo foi o descarte indevido de bolsas e o risco da transmissão sanguínea do *T. cruzi* simulando a utilização dos antígenos IBMP na triagem sorológica para a DC. Para esta finalidade, foram adotados os mesmos critérios utilizados pelo HEMOBA para descarte das bolsas (inaptas para doação), ou seja, amostras inconclusivas com índice de reatividade entre 0,75 e 1,00 ($0,75 \geq IR < 1,00$) e amostras positivas com índice de reatividade igual ou superior a 1,00 ($IR \geq 1,00$). Conforme descrito na figura 29, após a verificação do perfil sorológico utilizando a análise de classe latente como teste de referência, 4.993 amostras foram consideradas negativas para a DC. Deste quantitativo, 4 amostras foram

consideradas inaptas para doação pelo antígeno IBMP-8.1 por apresentarem índice de reatividade entre 0,75 e 1,00. Similarmente, 6 amostras foram inaptas para o antígeno IBMP-8.2, 7 para o antígeno IBMP-8.3 e 9 para o antígeno IBMP-8.4. Amostras negativas com índice de reatividade igual ou superior a 1,00 (falso-positivas) foram observadas para os antígenos IBMP-8.3 (n = 1) e IBMP-8.4 (n = 1). Do total de amostras inaptas para doação, o antígeno IBMP-8.4 foi o que apresentou o maior quantitativo de bolsas que poderiam ser descartadas indevidamente (n= 10 ;0,20%), seguido pela molécula IBMP-8.3 (n = 8; 0,16%), IBMP-8.2 (n = 6; 0,12%) e IBMP-8.1 (n = 4; 0,08%).

Quanto às amostras positivas, 3 (14,3%) amostras foram classificadas como negativas (falso-negativas) pelo antígeno IBMP-8.1 e 2 (9,5%) pelo antígeno IBMP-8.2, chamando atenção para o risco de transmissão do *T. cruzi* aos indivíduos que se beneficiarem dos hemoderivados provenientes destas bolsas. Uma amostra, por ter o resultado inconclusivo ($0,75 \leq IR < 1,00$), foi considerada inapta para doação quando analisada pelo antígeno IBMP-8.3. Este fato acende o sinal de alerta, visto que esta amostra apresentou índice de reatividade de 0,79, ficando próxima da zona de negatividade do ensaio ($IR < 0,75$). Por outro lado, o antígeno IBMP-8.4 classificou todas as amostras positivas corretamente, não havendo sinal de alerta ou de perigo.

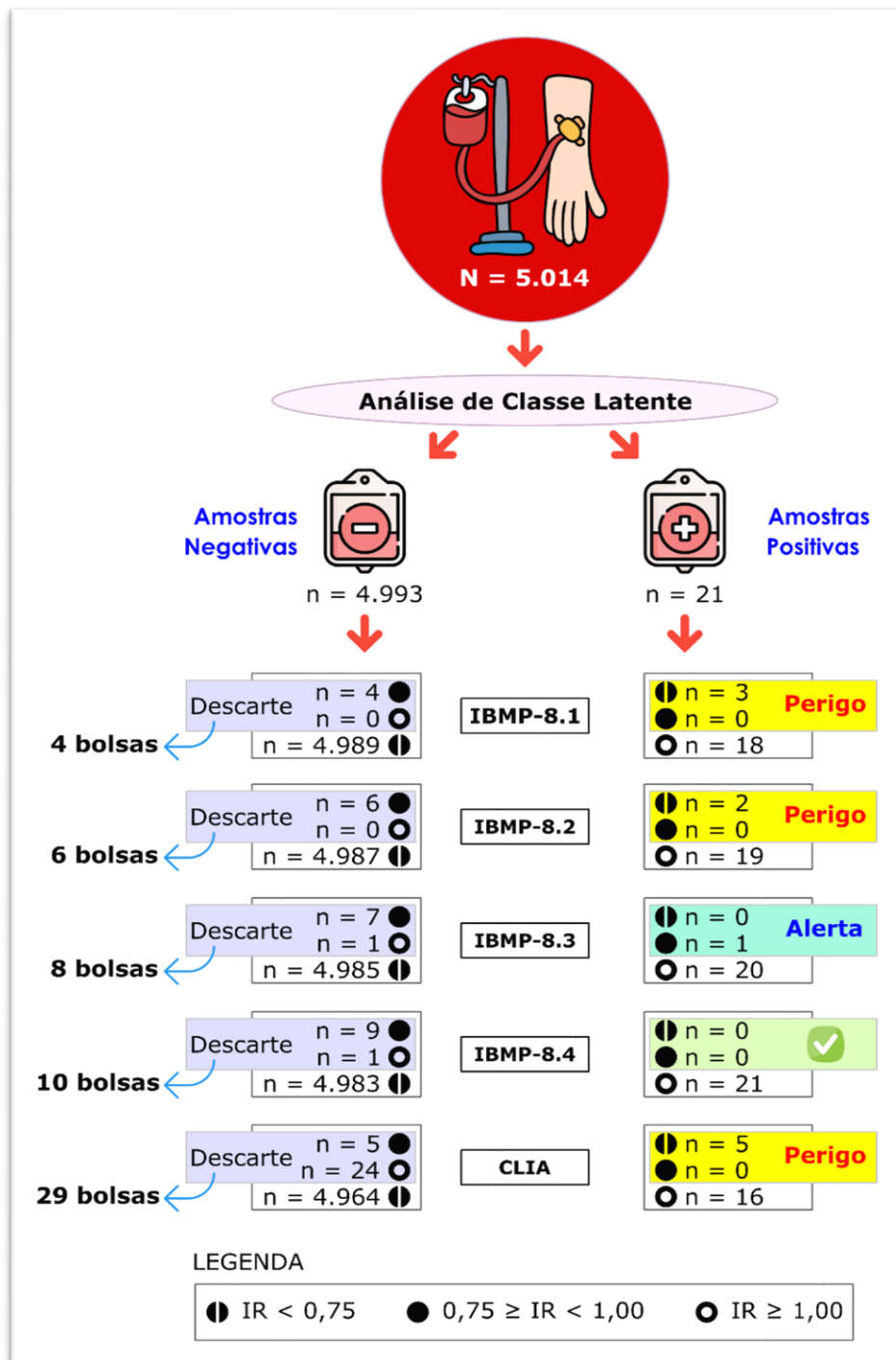


Figura 29 – Análise do uso dos antígenos IBMP na triagem sorológica para a DC crônica.

Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

A inexistência de um teste laboratorial de referência para a identificação da DC crônica tem contribuído negativamente tanto no diagnóstico sorológico quanto na triagem em bancos de sangue (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). No caso do diagnóstico sorológico, preconiza-se a utilização de dois testes de princípios metodológicos diferentes (OMS, 2002) ou do mesmo princípio, desde que sejam produzidos com matrizes antigênicas distintas (DIAS *et al.*, 2016). A concordância entre eles define o perfil sorológico do indivíduo como positivo ou negativo para a DC. Nos casos de discordância, um terceiro teste deve ser realizado. Devido ao grande quantitativo amostral analisado diariamente, esta estratégia torna-se inviável para a triagem sorológica de doadores em bancos de sangue. Por esta razão, a RDC n. 343, de 2002, retirou a obrigatoriedade da realização de dois testes no Brasil. Desta maneira, a triagem sorológica deve ser feita por um único teste de alta sensibilidade (ANVISA, 2002). Atualmente, os métodos quimiluminescentes (CLIA) consistem na metodologia de escolha nos hemocentros, pois são técnicas automatizadas e de elevada sensibilidade (ABRAS *et al.*, 2016; ABRAS *et al.*, 2020). No entanto, apresentam elevado custo de execução e, a depender da matriz antigênica usada para identificação de anticorpos anti-*T. cruzi*, podem fornecer resultados indesejados. De fato, em virtude da elevada sensibilidade, resultados falso-positivos são relatados (ABRAS *et al.*, 2016), elevando os custos para a confirmação diagnóstica da infecção, além de gerarem desgaste psicológico aos doadores que se encaixam nesta situação. De modo semelhante, resultados falso-negativos também podem ocorrer devido à matriz antigênica usada na fase sólida, incapaz de detectar a totalidade de cepas circulantes do *T. cruzi* (ABRAS *et al.*, 2020). Este fato deve-se à elevada variabilidade genética do parasito (BRENIÈRE *et al.*, 2016; ZINGALES *et al.*, 2018), necessitando de misturas complexas de antígenos para a sua detecção (ABRAS *et al.*, 2016). Apesar de serem altamente sensíveis, estas metodologias não são 100% sensíveis, indicando que uma parcela da população triada poderá ser diagnosticada como negativa. Nesta situação, os principais impactos negativos consistem na transmissão transfusional do *T. cruzi* e na impossibilidade de proporcionar assistência clínica adequada ao doador portador da DC crônica não identificado na triagem sorológica.

Uma forma de contornar esta situação, consiste na utilização de antígenos recombinantes quiméricos do *T. cruzi* como matriz antigênica dos testes de triagem. Nos últimos anos, quatro moléculas quiméricas do parasito (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4) foram sintetizadas por técnicas de engenharia genética, e seu potencial diagnóstico avaliado na

identificação da DC crônica utilizando amostras de indivíduos provenientes de países endêmicos e não endêmicos (SANTOS *et al.*, 2016b; SANTOS *et al.*, 2017a; SANTOS *et al.*, 2017b; DEL-REI *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2018). Trata-se de antígenos linearizados e formados por epítomos repetitivos de diferentes proteínas do protozoário. Foi verificado que esta estratégia permite identificar anticorpos anti-*T. cruzi* independente da cepa do parasita, elevando a sensibilidade dos ensaios sem, contudo, reduzir a especificidade (SANTOS *et al.*, 2017a; DOPICO *et al.*, 2019; DEL-REI *et al.*, 2019). Importante mencionar que as sequências que possuíam similaridade com espécies do gênero *Leishmania* spp. foram desconsideradas na construção dos antígenos quiméricos, tornando estas moléculas hábeis em diagnosticar a DC crônica em regiões de co-endemicidade tanto com a leishmaniose tegumentar quanto a visceral (DALTRO *et al.*, 2019). No presente estudo, nós avaliamos individualmente a capacidade das quatro moléculas na triagem sorológica da DC crônica utilizando 5.014 amostras provenientes da Fundação HEMOBA. Para este objetivo, a análise de classe latente foi empregada como padrão-ouro para definição do perfil sorológico dos doadores. Os resultados sorológicos do teste de triagem utilizado pelo HEMOBA (CLIA) não foram considerados nesta avaliação e foram disponibilizados somente após a conclusão das análises. Os resultados das avaliações propostas em nosso estudo serão discutidos mais detalhadamente a seguir.

6.1 DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL

Com base em parâmetros pré-estabelecidos, 4.754 amostras foram estimadas para a realização deste estudo. Para esta finalidade, foi adotada sensibilidade de 99%, erro absoluto (semi-amplitude do intervalo de confiança) de 2%, nível de confiança em 95% e prevalência de 0,02%. O valor de sensibilidade de 99% deveu-se a estudos prévios que mostraram sensibilidade média de 99% para a molécula IBMP-8.4 (SANTOS *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2016b; SANTOS *et al.*, 2017a). O valor de prevalência adotado para o dimensionamento amostral teve como base um estudo de meta-análise publicado em 2014, o qual estimou que cerca de 4,6 milhões de indivíduos sejam portadores da DC crônica no Brasil (MARTINS-MELO *et al.*, 2014). Considerando os critérios de exclusão previamente estabelecidos e estimando possíveis perdas durante a realização do estudo, foi previsto um acréscimo de 5% no número de soros, totalizando pouco mais de 5 mil amostras ($n = 5.014$), sendo este quantitativo representativo das 85.372 doações realizadas entre dezembro de 2018 e agosto de 2019. As aquisições das amostras foram realizadas na frequência de uma (segunda semana do

mês) ou duas vezes ao mês (segunda e quarta semanas do mês), a qual estava condicionada à disponibilidade dos funcionários do Setor de Imunologia do HEMOBA em separar as alíquotas. Com objetivo de minimizar viés de seleção, a aquisição das amostras contemplou todos os dias úteis da semana, ou seja, a primeira coleta foi realizada na segunda-feira, a segunda na terça-feira, a terceira na quarta-feira, a quarta na quinta-feira e, finalmente, a quinta na sexta-feira. Esta foi a forma encontrada para contemplar todos as regiões do Estado, visto que as remessas de alguns municípios do interior não eram diárias. O tamanho amostral de nosso estudo foi superior ao de muitos trabalhos disponíveis na literatura científica. De fato, diversos estudos, que tiveram como objetivo avaliar o desempenho de novos testes ou de testes comerciais na triagem sorológica da DC em bancos de sangue, apresentaram quantitativo amostral inferior ao nosso: $n = 315$ (ABRAS *et al.*, 2016), $n = 800$ (WHITMAN *et al.*, 2019), $n = 851$ (VERANI *et al.*, 2009), $n = 1.062$ (OELEMAN *et al.*, 1999), $n = 1.200$ (PIRARD *et al.*, 2005), $n = 1.309$ (UMEZAWA *et al.*, 2003), $n = 1.604$ (SAEZ-ALQUÉZAR *et al.*, 2000), $n = 1.951$ (LANGHI *et al.*, 2002), $n = 2.038$ (BERRIZBEITIA *et al.*, 2006), $n = 2.484$ (CHIPPAUX *et al.*, 2009), $n = 3.400$ (PONCE *et al.*, 2005). Por outro lado, quando a metodologia avaliada foi a quimiluminescência alguns estudos apresentaram quantitativos amostrais superiores ao nosso: $n = 7.911$ (CHANG *et al.*, 2006) e $n = 16.185$ (FLORES-CHAVEZ *et al.*, 2018). Somente um único estudo que avaliou um ELISA comercial (Ortho-Clinical Diagnostics) em bancos de sangue apresentou número amostral superior ao nosso: $n = 10.372$ (TOBLER *et al.*, 2007).

6.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população amostral utilizada no presente estudo foi de 5.014 doadores, sendo 2.144 (42,76%) do sexo feminino e 2.844 (56,72%) do sexo masculino. Estes dados estão de acordo com um estudo transversal descritivo realizado em 2019 em parceria com a Fundação HEMOBA, no qual foi demonstrado que a maioria dos doadores são do sexo masculino (MIRANDA *et al.*, 2019). Das amostras classificadas como positivas pela LCA, a maioria ($n = 13$; 61,9%) foi proveniente de doadores do sexo masculino. De modo similar, o Boletim Epidemiológico de DC Nº 01 – 2019, utilizando dados disponibilizados pelo HEMOBA no período de 22 de fevereiro de 2008 a 21 de fevereiro de 2018, mostrou que, dentre os 3.084 doadores não negativos para a DC, 61,9% foram do sexo masculino (SECRETARIA DO ESTADO, 2020). Segundo Cutrim *et al.* (2010), este fato ocorre possivelmente devido a

maior exposição e contato do gênero masculino com o meio ambiente em razão de suas atividades laborais, que exigem adentrar e estabelecer moradia em regiões que são habitat natural dos vetores da DC (CUTRIM *et al.*, 2010). Ainda segundo o Boletim Epidemiológico de DC Nº 01 – 2019, foi observado que 35,9% dos doadores não negativos para a DC foram provenientes de Salvador. Outros municípios também apresentaram valores significativos, tais como Barreiras (8,5%), Feira de Santana (3,2%), Juazeiro (2,7%), Lauro de Freitas (1,7%), Camaçari (1,7%), Vitória da Conquista (1,6%) e Jequié (1,4%). Os demais doadores (42%) foram provenientes de vários outros municípios baianos. Em nosso estudo, os resultados foram semelhantes. De fato, Salvador e Barreiras apresentaram os maiores quantitativos de amostras positivas para a DC, com 23,82% e 14,30% dos casos, respectivamente. Os demais foram representados por apenas um doador por município (4,75% por município), a saber: Barroso, Brumado, Canarana, Cotegipe, Cristópolis, Cruz das Almas, Feira de Santana, Iraquara, Jaguaquara, Santa Terezinha, São Desidério, São Felipe e Vitória da Conquista. A maior taxa de positividade encontrada para o município de Salvador foi provavelmente devido a confluência de indivíduos infectados de diversas localidades da Bahia, apresentando um alto índice demográfico.

No que diz respeito à faixa etária, foi verificado que a média da idade dos doadores positivos para a DC foi de 41,5 anos, com variação de 23 a 63 anos. Nossos dados estão de acordo com o reportado pelo Boletim Epidemiológico de DC Nº 01 – 2019 (SECRETARIA DO ESTADO, 2020). Segundo o Boletim, 92,8% dos 3.084 doadores não negativos para a DC apresentavam idade entre 20 e 59 anos de idade. Estes dados refletem a faixa etária de doadores no Brasil, não havendo correlação com a epidemiologia da DC crônica, que, atualmente, no Brasil, apresenta maior prevalência em populações com idade mais avançada (Costa *et al.*, 2001).

Os dados dos doadores (sexo, idade e município de origem) e das amostras utilizadas neste estudo (resultados sorológicos para os testes de triagem) só foram disponibilizados pela Fundação Hemoba após a finalização dos ensaios em nosso laboratório. Assim, após a análise dos dados, foi verificado que 79 doadores foram provenientes de outros estados brasileiros (AL, ES, GO, MG, PE, PR, RJ, RN, RS e SP) ou do Distrito Federal. Um outro fator observado foi a ausência de informações para 26 doadores. A permanência destas amostras em nosso estudo não impactou negativamente nossas análises, visto que nenhuma delas apresentou reatividade para os antígenos IBMP. Sendo assim, a exclusão destes doadores/amostras foi desnecessária.

6.3 ANÁLISE DE CLASSE LATENTE (LCA)

A análise de classe latente (LCA) foi utilizada como teste de referência para a classificação das amostras como positivas ou negativas para a DC crônica, conforme modelo validado previamente (SANTOS *et al.*, 2018). Refere-se a uma abordagem estatística multivariada com base em indicadores que expressam um construto categórico, também chamado de variável latente. Para definir a variável latente, capaz de identificar com precisão a infecção pelo *T. cruzi*, foram estabelecidos quatro indicadores representados pelos antígenos quiméricos IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4. Assim, as amostras foram agrupadas em duas categorias: "positiva" e "negativa", com base nos resultados obtidos para cada variável latente. As classes latentes foram caracterizadas com base nos padrões de resposta dos resultados positivos / negativos dos quatro antígenos quiméricos e nas probabilidades condicionais, ou seja, na probabilidade de ter um resultado específico (positivo / negativo) para um antígeno quimérico em relação a um diagnóstico individual (positivo / negativo). Um total de 16 padrões de respostas foram identificados, sendo agrupados em cinco categorias: P1 a P5. Do quantitativo de amostras inscritas no estudo, a LCA classificou 99,58% (4.993/5.014) como negativas, sendo a maioria (n = 4.991) pertencente à categoria P1 (resultado negativo para os 4 antígenos) e somente duas à categoria P2 (resultado negativo para 3 antígenos). Estes dados indicam que as amostras da categoria P1 possuem 100% de chance de serem de fato negativas para a infecção. Das duas amostras categorizadas como P2, uma delas reagiu para a molécula IBMP-8.3 e a outra para a IBMP-8.4, com chances de 0,3% e 0,8%, respectivamente, de serem positivas para a DC crônica. Portanto, a LCA classificou 4.993 amostras como negativas para a DC com probabilidade nula ou substancialmente baixa de erro. As demais amostras (21/5.014) foram classificadas como positivas, sendo 18 amostras pertencentes à categoria P5 (resultado positivo para os 4 antígenos) e três à categoria P3 (resultado positivo para 2 antígenos). As amostras categorizadas como P5 possuem 100% de chance serem realmente positivas para a DC. Das amostras do grupo P3, duas foram reativas para as moléculas IBMP8.3 e IBMP-8.4 e uma delas para os antígenos IBMP-8.2 e IBMP-8.4, com probabilidade de 99% e 95,7%, respectivamente, do resultado estar correto. Interessantemente, nenhuma amostra positiva foi classificada no grupo P4 (resultado positivo para 3 antígenos). Nossos achados estão de acordo ao relatado anteriormente por Santos e colaboradores (SANTOS *et al.*, 2018). De fato, a maioria dos resultados encontrados por estes autores pertenciam aos grupos P1 e P5. Neste mesmo estudo, somente duas amostras foram classificadas no grupo P3, as quais foram reativas para as moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4,

semelhantermente aos nossos achados. Por outro lado, os autores relataram que 2,7% (30/1.121) das amostras foram reativas para três moléculas, achado não encontrado em nosso estudo. Apesar de não ser amplamente utilizada para o diagnóstico da DC crônica, a LCA é uma ferramenta útil para as doenças que não possuem um padrão-ouro (IBIRONKE *et al.*, 2012; DA SILVA SOLCÀ *et al.*, 2014; LANGHI *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2016; SCHUMACHER *et al.*, 2016). Em nosso estudo, devido aos valores de probabilidade à posteriori para as amostras positivas e negativas, a utilização da LCA como teste de referência nos forneceu segurança na caracterização sorológica das amostras. Em 2019, um estudo utilizou a LCA (com os antígenos IBMP) para diagnosticar a DC em 829 amostras positivas para leishmaniose tegumentar (600) e visceral (229). Foi observado que 25 (4,2%) amostras positivas para leishmaniose tegumentar e 57 (24,9%) para leishmaniose visceral foram positivas para a DC crônica. Os autores afirmam que, se o diagnóstico da DC tivesse seguido as recomendações da OMS (dois testes de princípios metodológicos distintos ou do mesmo princípio, desde que sejam produzidos com matrizes antigênicas distintas), o quantitativo de resultado positivo para a DC subiria para 420 (70%) no grupo da leishmaniose tegumentar e 133 (58,1%) para a visceral (DALTRO *et al.*, 2019). Estes resultados demonstram a robustez da LCA no diagnóstico da DC utilizando os antígenos IBMP, justificando o seu uso neste trabalho. De fato, quando dois testes comerciais são utilizados para identificação da DC, um viés diagnóstico é inserido nos resultados em virtude das deficiências de precisão inerentes aos testes comerciais, o que eleva a incerteza dos resultados.

6.4 DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS IBMP

Após definição do perfil sorológico através da LCA, 21 amostras foram classificadas como positivas para a DC crônica e 4.993 amostras negativas. Com base nesta classificação, os parâmetros de desempenho foram obtidos individualmente para cada uma das moléculas IBMP. Este é um estudo de fase III, que 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, que são retrospectivos e utilizam amostras com perfil sorológico estabelecido. Na fase III, a condição sorológica dos indivíduos é desconhecida, pois não são usados previamente testes de referência para estabelecimento do diagnóstico. Assim, os parâmetros de desempenho podem ser comparados com aqueles obtidos a partir de testes comercialmente disponíveis (VRAY,

2015). 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. Contudo, 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 seus valores terão resultados distorcidos e conclusões errôneas sobre o desempenho dos testes, pois variam de acordo com a prevalência da doença (VRAY, 2015; OUCHCHANE; RABILLOUD; BOIRE, 2009). Assim, foi possível determinar pela primeira vez os valores preditivos positivos e negativos dos quatro antígenos IBMP.

Antes da determinação dos parâmetros de desempenho, os resultados foram analisados graficamente. Através desta análise, foi possível confirmar a capacidade discriminatória dos quatro antígenos em diferenciar amostras positivas das negativas. De fato, as médias geométricas obtidas para as amostras positivas foram, no mínimo, 8 vezes superiores àquelas obtidas para as amostras negativas (10,5 vezes para o IBMP-8.1 e IBMP-8.4; 8,6 vezes para o IBMP-8.2 e 12,3 vezes para o IBMP-8.3), levando a uma diferença significativa entre os dois grupos amostrais ($p < 0,0001$). Apesar de importante, a determinação da capacidade discriminatória dos antígenos não é objetivo do estudo de fase III, sendo objeto de estudo da avaliação de fase I, o qual foi conduzido no ano de 2016 (SANTOS *et al.*, 2016b). Quanto maior a diferença de sinal, melhor será a capacidade discriminatória do teste. Dentre as amostras positivas, o IBMP-8.4 foi o antígeno que apresentou a maior média geométrica (2,00), seguido pelo IBMP-8.3 (1,97), IBMP-8.2 (1,80) e IBMP-8.1 (1,68). Para as amostras negativas, o menor sinal foi observado para os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.3, seguido pelo IBMP-8.4 (0,19) e IBMP-8.2 (0,21). Nossos dados são similares àqueles encontrados em estudos anteriores que utilizaram estas moléculas (SANTOS *et al.*, 2017a; DOPICO *et al.*, 2019; DEL-REI *et al.*, 2019).

A análise dos parâmetros de desempenho foi iniciada através da determinação dos valores de AUC, utilizando gráficos de curva ROC. Estes valores refletem a capacidade das moléculas em discriminar amostras positivas para a DC das negativas. Quanto mais próximo de 100%, maior é a sua capacidade discriminatória. Em nosso estudo, foram encontrados valores de 99,31% para o antígeno IBMP-8.1, 98,68% para o IBMP-8.2, 99,99% para o IBMP-8.3 e 100% para o IBMP-8.4. Estes achados indicam que os quatro antígenos possuem valores de AUC perfeitos, considerando os valores de IC95% encontrados. Não houve diferença significativa entre eles, dada a sobreposição dos valores de IC95%. Os valores

relatados aqui estão de acordo com os estudos de fase I (SANTOS *et al.*, 2016b; SILVA *et al.*, 2020) e fase II (SANTOS *et al.*, 2017a; SANTOS *et al.*, 2017b), conduzidos anteriormente. De fato, no estudo de fase I os valores relatados foram de 99,64%, 99,43%, 98,39% e 99,98% para os antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4, respectivamente. Nos estudos de fase II, os resultados foram similares, independentemente da plataforma diagnóstica utilizada, se ELISA ou microarranjo líquido. No ELISA, por exemplo, os valores foram de 99,77%, 99,85%, 99,90% e 99,99%, respectivamente (SANTOS *et al.*, 2017a), enquanto que no microarranjo líquido os valores foram de 99,43%, 99,14%, 99,22% e 99,55%, respectivamente (SANTOS *et al.*, 2017b). Desta forma, observa-se que não há diferença entre os nossos resultados daqueles citados acima. Todavia, os valores de AUC encontrados para os antígenos IBMP foram superiores àqueles descritos para misturas de diversos epítomos sintéticos (MUCCI *et al.*, 2017). Resultados semelhantes foram observados quando os antígenos multi-epítomo TSSA-CL e p30-50 foram analisados, os quais obtiveram valores de AUC de 96,47% e 97,41%, respectivamente (BALOUZ *et al.*, 2015). Valores superiores também foram observados quando o desempenho dos antígenos IBMP foram comparados a diversos testes comerciais, a exemplo do Abbott Chagas Elisa com AUC de 97,1% (BRASIL; CASTRO; CASTRO, 2016). Por outro lado, alguns antígenos multi-epítomo, como o CP1, CP3 e CP1 + CP3, apresentaram valores de AUC similares aos encontrados para os antígenos IBMP (PEVERENGO *et al.*, 2018). Contudo, os autores utilizaram um painel amostral contendo somente 67 amostras de doadores, quantitativo amostral expressivamente menor do que aquele empregado no presente estudo.

Para a análise da sensibilidade foram utilizadas as 21 amostras classificadas como positivas pela LCA. O baixo quantitativo de amostras positivas (0,42%; 21/5.014) impacta negativamente a determinação da sensibilidade, caso haja resultados falso-negativos. De fato, se todas as amostras forem classificadas como positivas por uma das moléculas a sensibilidade do teste será de 100%. Contudo, caso uma amostra seja falso-negativa a sensibilidade será reduzida para 95,24%; no caso de 2 amostras o valor cai para 90,48%. Isso significa que a cada resultado falso-negativo há redução de 4,76% do valor de sensibilidade. Por outro lado, para a determinação da especificidade o tamanho amostral foi expressivamente superior ($n = 4.993$). Neste caso, a presença de um resultado falso-positivo reduziria somente 0,02% o valor da especificidade (de 100% passaria para 99,98%). Como este é um estudo de fase III, não é possível controlar o quantitativo amostral de cada grupo, pois o perfil sorológico das amostras inscritas no estudo é desconhecido. Para ampliar a população positiva para 500 amostras, por exemplo (com redução de apenas 0,2% do valor de

sensibilidade a cada resultado falso-negativo), o universo de doadores deveria ser de 118.881 amostras, inviabilizando a realização do estudo de fase III. É importante salientar que a prevalência da DC crônica na população estudada foi de apenas 0,42%. Desta forma, assumimos o baixo quantitativo de amostras positivas como uma limitação na determinação da sensibilidade das moléculas IBMP. De fato, o valor de sensibilidade para o antígeno IBMP-8.1 foi de 85,7%, o menor valor encontrado dentre os quatro antígenos. Este resultado é contraditório ao relatado em outros estudos que utilizaram o IBMP-8.1 como matriz antigênica. Nos estudos de fase I (SANTOS *et al.*, 2016b) e II (SANTOS *et al.*, 2017a), utilizando o ELISA indireto como plataforma diagnóstica, os valores foram de 98,9% e 97,4%, respectivamente. No microarranjo líquido os valores nas fases I (SANTOS *et al.*, 2016b) e II (SANTOS *et al.*, 2017a) foram de 98,6% e 97,7%, respectivamente. Valores superiores também foram relatados quando o antígeno IBMP-8.1 foi usado para diagnosticar indivíduos residentes tanto em áreas endêmicas (DEL-REI *et al.*, 2019) quanto em não endêmicas (DOPICO *et al.*, 2019) para a DC crônica, com valores de sensibilidade de 95,3% e 99,4%, respectivamente. O baixo valor de sensibilidade da molécula IBMP-8.1 em nosso estudo foi devido aos 3 resultados falso-negativos encontrados para esta molécula. Em virtude do baixo quantitativo amostral, os valores de IC95% são amplos, sugerindo que esta molécula pode apresentar valores que vão de 65,4% a 95,0%. Apesar do IC95% atingir a sensibilidade de 95,0%, não foi observada sobreposição com os IC95% dos estudos realizados anteriormente, indicando que o valor de sensibilidade do IBMP-8.1 encontrado aqui foi significativamente menor do que aqueles descritos nos estudos supracitados.

Situação semelhante foi observada para o antígeno IBMP-8.2, o qual apresentou sensibilidade de 90,5% devido à presença de dois resultados falso-negativos. Ao considerar os valores de IC95% encontrados para esta molécula foi observada sobreposição com os valores reportados no estudo de fase II utilizando o ELISA indireto como plataforma diagnóstica (SANTOS *et al.*, 2017a). De fato, encontramos em nosso estudo IC95% que variou de 71,1% a 97,4%, enquanto no estudo de fase II esta variação foi de 92,5% a 95,7%. Entretanto, a sensibilidade do IBMP-8.2 foi significativamente inferior àquela encontrada no estudo de fase II utilizando o microarranjo líquido (98,3%; IC95% 97,0-99,2) (SANTOS *et al.*, 2017b). A diferença de valores entre as duas metodologias deve-se provavelmente a sensibilidade analítica inerente a cada sistema. De fato, o microarranjo líquido é um sistema capaz de detectar menores quantidades de anticorpos específicos quando comparado ao sistema colorimétrico do ELISA indireto (HOARE *et al.*, 2016; KULLER *et al.*, 2005), reduzindo, desta maneira, o quantitativo de resultados falso-negativos, especialmente para os indivíduos

com baixos títulos de anticorpos específicos circulantes. Os antígenos IBMP-8.3 e IBMP-8.4 apresentaram os maiores valores de sensibilidade, os quais foram compatíveis com a literatura. Estudos de fase I e II apontam que os valores de sensibilidade variaram de 95,4% a 99,3% para o antígeno IBMP-8.3 e de 99,1% a 100% para o IBMP-8.4. De fato, os valores encontrados no presente estudo foram de 95,2% e 100% para o IBMP-8.3 e o IBMP-8.4, respectivamente. Em todos os estudos conduzidos até o momento, o IBMP-8.4 foi o antígeno que apresentou o maior valor de sensibilidade, independente da população de estudo e da metodologia aplicada. Este fato deve-se à constituição da molécula, a qual possui um maior repertório de epítomos em comparação com as demais, o que a torna mais reativa a uma maior diversidade de anticorpos anti-*T. cruzi*.

Os valores de acurácia para todos os antígenos foram superiores ou iguais a 99,4%. A acurácia avalia o quantitativo de resultados diagnosticados corretamente no universo de amostras analisadas, levando em consideração tanto as positivas quanto as negativas. Os altos valores de acurácia ocorreram por dois motivos: grande quantitativo de amostras negativas e elevada especificidade encontrada para todas as moléculas (99,98% a 100%). Assim, os resultados falso-negativos relatados para as moléculas IBMP-8.1 e IBMP-8.2, que impactaram negativamente a sensibilidade dos testes, não exerceram influência significativa nos valores da acurácia. Em estudos anteriores, os valores de acurácia reportados para os antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2 e IBMP-8.3 foram inferiores aos encontrados aqui. Este fato deve-se ao quantitativo de amostras positivas e negativas destes estudos serem semelhantes. Aqui, o quantitativo de amostras de cada grupo foi desigual, sendo utilizadas 4.993 amostras negativas e apenas 21 positivas. Apesar destas diferenças, o valor de acurácia do IBMP-8.4 encontrado por nós foi similar ao relatado nos estudos anteriores, independentemente do tipo de estudo (fase I ou II), da população analisada, se proveniente de áreas endêmicas ou não endêmicas para a DC, e da plataforma diagnóstica utilizada (SANTOS *et al.*, 2016b; SANTOS *et al.*, 2017a; SANTOS *et al.*, 2017b; SANTOS *et al.*, 2018; DOPICO *et al.*, 2019; DEL-REI *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020).

Conforme mencionado anteriormente, as características deste estudo (fase III) nos permitiram determinar dois parâmetros até então desconhecidos para os antígenos IBMP: os valores preditivos positivo e negativo. O valor preditivo positivo (VPP) indica a probabilidade do indivíduo com resultado positivo no teste ser realmente portador da DC. Desta forma, os indivíduos que apresentarem resultado positivo para as moléculas IBMP-8.1 e IBMP-8.2 terão 100% de chance de serem realmente portadores da DC, enquanto que cerca de 95% daqueles

que forem reativos para as moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4 serão de fato portadores da DC. Já o valor preditivo negativo (VPN) estabelece a probabilidade de um indivíduo com um resultado negativo no teste não ser portador da DC. Os valores de preditivos negativos foram iguais ou superiores a 99,94% para os antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2 e IBMP-8.3, enquanto que, para o IBMP-8.4 o valor foi de 100%. Estes dados indicam que praticamente todos os indivíduos que testarem negativos em qualquer uma das quatro moléculas serão de fato negativos para a DC. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo que avaliou a capacidade de um ensaio de quimiluminescência (Architect Chagas) em ser utilizado como teste único para o diagnóstico da DC (ABRAS *et al.*, 2016). Neste estudo, apesar do uso de amostragem de conveniência, os autores relataram valores de 95,58% e 100% para o VPP e VPN, respectivamente. Um estudo mais antigo, publicado em 1993, determinou o VPP e o VPN de cinco testes comerciais de ELISA em diagnosticar a DC, sendo relatados valores que variaram de 97% a 100% e de 94% a 100%, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 1993). Valores mais baixos de VPP e VPN foram atribuídos aos testes que utilizam antígenos brutos como matriz antigênica. Por outro lado, o teste que utilizou uma mistura de antígenos recombinantes (CRA + FRA) apresentou valores semelhantes (VPP de 100% e VPN de 99%) aos encontrados no presente estudo para os antígenos IBMP. Por outro lado, um outro estudo avaliou o desempenho de três testes comerciais de ELISA (Hemagen, Ortho, and Wiener) e um teste rápido (InBios) em diagnosticar a DC em doadores de sangue dos Estados Unidos (WHITMAN *et al.*, 2019). Os autores observaram valores variados de VPP e VPN, muitos dos quais foram inferiores ao encontrado pelo nosso grupo, a saber: Hemagen (VPP = 100%; VPN = 83,33%), Ortho (VPP = 100%; VPN = 88,76%), Wiener (VPP = 99,58%; VPN = 90,85%) e InBios (VPP = 95,49%; VPN = 95,52%).

A avaliação de testes diagnósticos usando apenas sensibilidade, especificidade e acurácia, como parâmetros de desempenho, é insuficiente para medir sua influência em decisões clínicas. Um teste diagnóstico só será útil se seus resultados modificarem a probabilidade de ocorrência da doença. As razões de verossimilhança (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 não portadores (SACKETT *et al.*, 1998). 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 os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.2. Nesta situação, uma estratégia baseia-se na estimativa dos valores da RV subtraindo ou adicionando um determinado valor dos parâmetros de sensibilidade e especificidade (RODRÍGUEZ ARTALEJO *et al.*, 1990;

SANTOS *et al.*, 2017a). Como utilizamos duas casas decimais para expressar os parâmetros de desempenho nesta fase do estudo, então adicionamos 0,01 de cada um deles. Assim, os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.2 apresentaram RV^+ estimado de 427.803 e 451.557 indicando que um indivíduo com DC apresenta aproximadamente 427.803 e 451.557 vezes mais probabilidade de ser diagnosticado com a DC caso seja submetido a um teste usando estas moléculas, respectivamente. Para os demais antígenos esta probabilidade reduz para 4.755 para o IBMP-8.3 e 4.941 para o IBMP-8.4. Para as amostras negativas o raciocínio é semelhante. O valor de 0,0005 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 teste. Para as moléculas IBMP-8.3, IBMP-8.2 e IBMP-8.1 os valores foram de 0,0480, 0,0960 e 0,1432, respectivamente. Através da relação dos valores de RV^+ e RV^- é possível determinar os valores de *odds ratio* diagnóstico (ORD). Valores de ORD variam de zero ao infinito e quanto maior for mais confiável será o teste para ser aplicado à população (para diagnóstico tanto de indivíduos positivos quanto de negativos para o agravo em estudo). Desta forma, o antígeno IBMP-8.4 foi o que apresentou o maior valor de ORD (10.483.200), seguido pelo IBMP-8.2 (4.722.244), IBMP-8.1 (2.987.511) e IBMP-8.3 (99.840). Os nossos resultados então de acordo ao relatado no estudo que fase II, que aprontou a molécula IBMP-8.4 como a mais confiável dentre os quatro antígenos. Os valores de ORD encontrados no presente estudo foram superiores aos de testes comerciais usados para o diagnóstico da DC crônica. Para os kits Gold ELISA Chagas (Rem Diagnóstica, São Paulo, Brasil) e para o Pathozyme Chagas (Omega Diagnostics, Escócia, Reino Unido), os valores foram de 30.945 e 1.731, respectivamente (SANTOS *et al.*, 2017a). O primeiro deles utiliza mistura de antígenos recombinantes e lisado de cepas brasileira como matriz antigênica, enquanto que o segundo utiliza misturas de antígenos recombinantes. Assim, independentemente do tipo de antígeno, as moléculas IBMP apresentaram valores de ORD muito superiores aos encontrados por ambos os testes comerciais. De fato, três das quatro moléculas avaliadas apresentaram valores na casa dos milhões, enquanto os testes comerciais não passaram de 31 mil, indicando a sua superioridade diagnóstica.

Para as quatro moléculas a probabilidade pré-teste foi de 0,42%. Este valor indica a probabilidade do resultado ser positivo antes da realização do teste. Refere-se à prevalência da doença na localidade de residência do indivíduo (PRINZI, 2020). Já a probabilidade pós-teste pode ser positiva ou negativa. O primeiro caso avalia a probabilidade de um indivíduo ter a infecção caso o resultado do teste seja positivo, enquanto que a probabilidade pós-teste negativa estabelece a probabilidade do indivíduo ter a infecção caso o resultado do teste seja

negativo. Desta forma, espera-se resultados próximos de 100% na probabilidade pós-teste positiva e valores próximos a zero na negativa. As moléculas IBMP-8.1 e IBMP-8.2 atingiram valores próximos a 100% (> 99,9%) para a probabilidade pós-teste positiva, sendo superiores aos descritos para os demais antígenos (95,24% para o IBMP-8.3 e 95,45 para o IBMP8.4). Contudo, devido à sobreposição dos IC 95%, não houve diferença significativa entre eles. Contrariamente, a probabilidade pós-teste negativa apresentou valores extremamente baixos. De fato, o antígeno IBMP-8.4 aparentou o valor mais baixo (0,00001) dentre os quatro antígenos, porém sem significância estatística devida a sobreposição do IC 95%. A escassez de literatura científica pertinente a este tipo de avaliação limita as comparações com os resultados obtidos pelo nosso grupo.

6.5 ANÁLISE DE COINFEÇÃO E REATIVIDADE CRUZADA

A análise de coinfeção mostrou que, dentre as 21 amostras classificadas como positivas pela LCA, seis apresentaram coinfeção com outras doenças, sendo elas HTLV, sífilis, anti-Hbc e HCV. O HTLV e o HCV possuem características semelhantes, são sexualmente transmissíveis, endêmicos e considerados um problema de saúde pública no Brasil, sua forma de transmissão facilita a coinfeção das doenças, o HTLV tem uma prevalência de 0,84% na Bahia, enquanto o HCV tem de 1,3% (PEREIRA, 2019). Assim como o HTLV e o HCV, sífilis também é uma doença infecciosa sexualmente transmissível e bastante é prevalente no Brasil. Trata-se de uma doença de notificação compulsória e, a cada ano, os casos aumentam exponencialmente (BRASIL, 2019b; SILVA *et al.*, 2020). No Brasil, a taxa de prevalência para o HBV é baixa, muito provavelmente devido a imunização por meio da vacina que está disponível há mais de 20 anos (CARVALHO *et al.*, 2017; BRASIL, 2009), apesar disso ainda existem indivíduos não vacinados e em situação de risco, além do mais, assim como o HCV, o HBV é transmitido pelo sangue (via parenteral e vertical), via sexual e por compartilhamento de objetos pessoais contaminadas (BRASIL, 2009). Desta forma, pode-se dizer que devido a suas formas de transmissões é comum encontrar coinfeção entre o HTLV, HCV, sífilis e HBV.

Em nosso estudo não houve reatividade cruzada para nenhum dos quatro antígenos IBMP. Somente duas amostras foram classificadas dentro da zona de inconclusividade ($CO \pm 10\%$) quando analisadas pelos antígenos IBMP-8.2 e IBMP-8.4. Estes resultados corroboram com estudos anteriores realizados com as moléculas para diversas doenças infecto-parasitárias, como dengue, HBV, HCV, HIV, HTLV, leishmaniose, esquistossomose, filariose,

leptospirose, sarampo, rubéola, sífilis (SANTOS *et al.*, 2017a). Neste estudo, foi utilizado um total de 851 amostras e o descritivo de reatividade cruzada ficou abaixo de 0,59%. De modo similar, o índice de amostras classificadas na zona de inconclusividade ficou abaixo de 0,47%. Interessantemente, a molécula IBMP-8.4 não apresentou resultado inconclusivo em nenhuma das 851 analisadas. Um estudo mais recente objetivou avaliar a reatividade cruzada dos quatro antígenos utilizando 829 amostras positivas para leishmaniose, sendo 600 para a forma tegumentar e 229 para a visceral (DALTRO *et al.*, 2019). Os autores relataram índices de reatividade bastante baixos (<0,70% para leishmaniose tegumentar e > 3,5 para leishmaniose visceral). Interessante citar que os valores de reatividade destas mesmas amostras foram superiores a 19,3% para leishmaniose tegumentar e 18% para leishmaniose visceral quando testes comerciais foram avaliados. Ainda em 2019, gestantes do serviço de saúde pública de Barcelona/Espanha, positivas para a infecção causada pelo vírus da Zika ou portadoras de toxoplasmose, foram analisadas pelos antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4. No entanto, nenhuma amostra apresentou positividade ou teve índice de reatividade na zona cinza (DOPICO *et al.*, 2019).

6.6 ANTÍGENOS IBMP E CLIA NA TRIAGEM SOROLÓGICA

Uma vez que os parâmetros de desempenho foram estabelecidos para cada um dos antígenos IBMP, a próxima fase do estudo baseou-se na análise do seu uso na triagem sorológica para a DC. Considerando as amostras classificadas como negativas pela LCA, o quantitativo de bolsas descartadas por apresentarem resultado falso-positivo seria de duas, uma delas com resultado falso-positivo para a molécula IBMP-8.3 e a outra para a molécula IBMP-8.4. Os hemocentros, por critério de segurança, reduzem o ponto de corte em 20 a 25% do valor estipulado pelo fabricante, visando reduzir ao máximo a possibilidade de transmissão de patógenos transmitidos pelo sangue. A Fundação HEMOBA, por exemplo, reduz 25% o valor do ponto de corte. Desta forma, amostras com índice de reatividade entre 0,75 e 0,99 são consideradas inaptas para transfusão. Considerando estes valores, 4 bolas foram consideradas inaptas quando triadas pela molécula IBMP-8.1, 6 pela IBMP-8.2, 7 pela IBMP-8.3 e 9 pela IBMP-8.4. Assim, a molécula IBMP-8.4 foi aquela que apresentou o maior quantitativo de bolsas descartadas (n = 10), considerando tanto as amostras falso-positivas quanto aquelas inaptas por redução do ponto de corte. Ela foi acompanhada pela molécula IBMP-8.3 (n = 8), IBMP-8.2 (n = 6) e pela IBMP-8.1 (n = 4). Diferentemente, a análise das amostras positivas mostrou que a IBMP-8.4 foi a única molécula que diagnosticou todas as

amostras com índice de reatividade inferior a 0,75. Para a molécula IBMP-8.3, somente uma amostra apresentou índice de reatividade entre 0,75 e 0,99. Ao considerar o índice de reatividade desta amostra em 0,79 um sinal de alerta é emitido, pois, caso esta amostra apresentasse sinal um pouco mais baixo (<0,75) a amostra seria considerada apta e a bolsa seria liberada para transfusão, com possibilidade de infecção dos receptores. As moléculas IBMP-8.1 e IBMP-8.2 apresentaram, respectivamente, 3 e 2 amostras falso-negativas, sugerindo que o seu uso isolado na triagem sorológica da DC em bancos de sangue não é aconselhado. No entanto, o uso combinado destas moléculas, entre elas e com as demais IBMP, é seguro, visto que as amostras com resultado falso-negativo ou na zona de exclusão não são as mesmas quando os quatro ensaios são analisados. Das 5.014 amostras analisadas, a molécula IBMP-8.4 foi a que levou a um maior número de bolsas descartadas (n = 10), seguida pela IBMP-8.3 (n = 9), IBMP-8.2 (n = 8) e IBMP-8.1 (n = 7). Apesar do maior número de bolsas ser descartada sob uso da molécula IBMP-8.4, esta foi a única molécula que apresentou segurança de ser utilizada isoladamente na triagem sorológica em bancos de sangue. A molécula IBMP-8.3, apesar de não ter identificado nenhuma amostra positiva como negativa, deve ser usada com cautela e necessita da avaliação de uma maior quantitativo amostral para maiores conclusões.

Quanto ao CLIA, o quantitativo de amostras negativas descartadas é de 29, sendo 5 por resultado falso-positivo e 24 por apresentar sinal de reatividade na zona de inaptidão. Para as amostras positivas o sinal de perigo acende prontamente em virtude da possibilidade de utilização de cinco bolsas triadas como negativas para a DC. Este fato é bastante preocupante e chama a atenção de que os antígenos utilizados por este fabricante não são capazes de identificar a integralidade de doadores não negativos para a DC. Além disso, o descarte de 29 bolsas negativas traz prejuízo ao setor público de saúde, não somente pelo verba investida na captação e coleta dos doares e triagem sorológicas das bolsas, mas também custos indiretos pela diminuição de oferta de bolsas disponíveis para transfusão. Cada doador tem um custo estimado de R\$ 6,89 para a triagem da DC, considerando que 29 bolsas seriam descartadas se submetidas à análise do CLIA o prejuízo seria aproximadamente R\$ 199,81. Convertendo estes valores em gasto anual haveria desperdício significativo de recursos financeiros. No geral, o Brasil tem uma prevalência de 0,02% para a DC (MARTINS-MELO *et al.*, 2014), considerada baixa, como foi mencionado anteriormente nesse estudo. Assim, um ensaio com especificidade menor que 98,5% levaria a mais resultados falso-positivos do que verdadeiros positivos (WHITMAN *et al.*, 2019). Tal lacuna poderia ser facilmente preenchida com o uso dos quatro antígenos, principalmente com o IBMP-8.1 e IBMP-8.2 devido a sua

especificidade 100%. O uso combinado das moléculas, a por exemplo da IBMP-8.4 na primeira etapa do diagnóstico, eliminaria todos os falso-negativos, em seguida o IBMP-8.1 ou IBMP-8.2 poderiam ser empregados para descartar os resultados falso-positivos. Desta forma, teríamos um diagnóstico mais eficaz e seguro, levando ao descarte de um menor quantitativo de bolsas e reduzindo custos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A molécula IBMP-8.4 apresentou o melhor desempenho e é segura para ser utilizada isoladamente na triagem sorológica em bancos de sangue;
- Os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.2, apresentaram os melhores índices de especificidade, enquanto o IBMP-8.4 apresentou a melhor sensibilidade;
- Não foi observado reação cruzada para os quatro antígenos;
- O uso das moléculas em bancos de sangue reduziria consideravelmente o descarte indevido de bolsas, bem como aumentaria a segurança.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliação do desempenho diagnóstico dos antígenos IBMP utilizando a quimiluminescência como plataforma diagnóstica;
- Avaliação das proteínas em um estudo de Fase IV.

REFERÊNCIAS

- ABRAS, A. *et al.* Serological diagnosis of chronic Chagas disease: is it time for a change? **Journal of clinical microbiology**, Washington v. 54, n. 6, p. 1566-1572, Apr. 2016.
- ABRAS, A. *et al.* ARCHITECT Chagas® as a single test candidate for Chagas disease diagnosis: evaluation of two algorithms implemented in a non-endemic setting (Barcelona, Spain). **Clinical Microbiology and Infection**, Jul. 2020.
- ANVISA. RDC no 343, de 13 de dezembro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 dez 2002. Seção 1, p. 133. Disponível em: http://www.aeap.org.br/doc/resolucao_rdc_343_de_13_de_dezembro_de_2002.pdf. Acesso em: 23 jun. 2019.
- ANVISA. RDC nº 153 de 14 de junho de 2004. **Diário Oficial da União**. República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 de jan. 2004. Disponível em: http://www.sbpc.org.br/upload/noticias_gerais/320100416113458.pdf em: 05 dez. 2018.
- ANVISA. Relatório dos dados da produção hemoterápica brasileira-Hemoprod 2013. 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/4048533/5234223/Relat%C3%B3rio+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+Hemoter%C3%A1pica+2015/0a55a004-12ad-4955-becc-f1ba609f3fe5>. Acesso em: 23 jun. 2019.
- ANVISA. 6º Boletim de PRODUÇÃO HEMOTERÁPICA Hemoprod 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/4048533/4993603/6%C2%B0+Boletim+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+Hemoter%C3%A1pica+-+Hemoprod+2017/15545fd5-ad1f-4b00-9340-a811aa910bbc>. Acesso em: 01 mai. 20120.
- AKHAVAN, D. Análise de custo-efetividade do programa de controle da DC no Brasil. **OPAS**, p. 87, 2000.
- AKOBENG, A. K. Understanding diagnostic tests 2: likelihood ratios, pre-and post-test probabilities and their use in clinical practice. **Acta paediatrica**, v. 96, n. 4, p. 487-491, feb. 2007.
- 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, oct-dec.1990.
- ALMEIDA A. B, *et al.* Sexual transmission of American trypanosomes from males and females to naive mates. **Journal of Visualized Experiments**, Boston, v. 143, jan. 2019.
- AMANTO, N. V. Conduta frente ao doador chagásico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Goiânia, v. 26, n. 86, p. 7, 1993.
- AÑEZ, N. *et al.* Valoración comparativa de pruebas serodiagnósticas utilizadas para detectar enfermedad de Chagas en Venezuela. **Boletín de Malariología y salud ambiental**, Maracay, v. 50, n. 1, p. 17-27, 2010.

ANDRADE, A. S. *et al.* Serologic screening for *Trypanosoma cruzi* among blood donors in central Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, Washington, v. 26, n. 2, p. 157-164, 1992.

ANDRADE, S.G. Patologia experimental da DC. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (Orgs). **Trypanosoma cruzi e DC**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.177-200.

ARAUJO, 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, jul. 1986.

ARAÚJO, A. B.; VIANNA, E. E.; BERNE, M. E. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody detection in blood donors in the Southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 12, n. 6, p. 480-482, dec. 2008.

ARAÚJO, P. F. *et al.* Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 6, p. 437-446, jun. 2017.

ARCE-FONSECA, M. *et al.* Specific humoral and cellular immunity induced by *Trypanosoma cruzi* DNA immunization in a canine model. **Veterinary Research**, Paris, v. 44, n. 1, p. 15, mar. 2013.

ASHALL, F. *et al.* Radiolabeled total parasite DNA probe specifically detects *Trypanosoma cruzi* in mammalian blood. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 3, p. 576-578, mar. 1988.

Australian Bureau of Statistics, 2006. **Census of population and Housing**. Cat. No.2068.0-2006 Census Tables 2/27/2009. <http://www.abs.gov.au/>. Acesso em 07 de maio de 2019.

AZOUGUE, E.; DARRAS, C. Estudio prospective de la enfermedad de Chagas en recién nacidos con infección placentaria. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 24, p. 105-109, 1991.

AZOGUE, E.; FUENTE, C.; DARRAS, C. H. Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 79, n. 2, p. 176-180, jan. 1995.

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, Jan. 2015.

BARRETT, M. P. *et al.* The trypanosomiasis. **The Lancet**, London, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, nov. 2003.

BARRETTO, M. P.; RIBEIRO, R. D. Reservatórios silvestres do *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* Chagas, 1909 [doença animal, animal selvagem]. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 25-36, 1979.

BARUFFA, G. Prevalência da infecção chagásica no banco de sangue da Santa Casa de Misericórdia de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 21, p. 37-42, 1979.

BRENER, Z. ANDRADE, Z. A. BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e DC. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. *Advances in parasitology*, v. 75, p. 19-47, 2011.

BERN, C. Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 5, p. 456-466, Jul. 2015.

BITTENCOURT, A. L.; SADIGURSKY, M.; BARBOSA, H. S. DC congênita. Estudo de 29 casos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 17, p. 146-159, 1975.

BITTENCOURT, A. L. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 403-408, sept./oct. 1992.

BLOOD PRODUCTS ADVISORY COMMITTEE *et al.* Transcripts of the September 12, 2002, Blood Products Advisory Committee Meeting. Rockville (MD): CBER. 2002.

BRASIL. Portaria CNH 4 de 25 de setembro de 1969. **Diário Oficial da União Comissão Nacional de Hemoterapia**, Brasília, Nº 10, Seção 1, p. 343, 1970.

BRASIL. Lei nº 7.649, de 25 de janeiro de 1988. **Diário Oficial da União. República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 de jan.1988. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/1980-1988/L7649.htm. Acesso em: 04 aug. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **DC – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde público**. Brasília, 1998. Disponível em: https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22100/mod_resource/content/1/manualChagas.pdf. Acesso em: 16 jun. 2019.

BRASIL. Lei nº 10.205, de 21 de março de 2001: Regulamenta o § 4º do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução adequada dessas atividades, e dá outras providências. **Diário Oficial da União. República Federativa do Brasil**, Brasília, 21 de mar. 2001. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/leis_2001/110205.htm. Acesso em: 04 aug 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual técnico para investigação da transmissão de doenças pelo sangue**. Brasília: Ministério da Saúde; 2004. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_transmissao_doencas_sangue.pdf. Acesso em: 16 jun. 2019

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf. Acesso em: 25 mai. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da DC aguda e crônica. **Revista Patologia Tropical**, v. 42, n. 4, 2013a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **DC: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção**. 2013b. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-Chagas>. Acesso em 17 may. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. 2014a. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_unificado.pdf. Acesso em: 24 apr. 2019

BRASIL. Ministério da Saúde. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados. **Caderno de informação: sangue e hemoderivados: produção hemoterápica**. Brasília, 2014b. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_informacao_sangue_hemoderivados_7ed.pdf. Acesso em: 04 aug 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. DC aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Bol Epidemiol**, v. 46, n. 21, 2015. Disponível: portalms.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020.MI.pdf. Acesso em: 8 may. 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos**. 2016. Disponível: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0158_04_02_2016.html. Acesso em: 16 jun 2019.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde**. Brasília, 2017. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html. Acesso em 24 apr. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doação de sangue: requisitos, como doar, quem pode doar, impedimentos**. 2018. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doacao-de-sangue>. Acesso em: 26 jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. DC Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, 2019a. Disponível em: portalms.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/23/2018-025.pdf. Acesso em: 8 de mai de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**, 2019b. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2019>. Acesso em: 12 Jul. 2020

BRASIL. PORTARIA Nº 264, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2020. **Diário Oficial da União**. República Federativa do Brasil, Brasília, 17 de fev.2020. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html. Acesso em: 01 de mai de 2020.

BRENIÈRE, S. F. *et al.* Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 53, n. 2, p. 179-184, Aug. 1995

BRENIÈRE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. e0004792, Aug. 2016.

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.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 8, n. 5, p. 227-35, Sep. 1966.

CAMPOS, F.M.F. *et al.* Usefulness of FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1 as confirmatory assay for nonnegative results in blood bank screening of Chagas disease. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 455, p 34-40, Apr. 2018.

CAMUSSONE, C. *et al.* Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. **Clinical and vaccine immunology**, Washington, v. 16, n. 6, p. 899-905, Jun. 2009.

CARLIER, Yves *et al.* Congenital Chagas disease: an update. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 363-368, May. 2015.

CARVALHO, M. R. *et al.* Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. **Transfusion**, London, v. 33, n. 10, p. 830-834, Oct. 1993.

CARVALHO, P. M. R. S. *et al.* Prevalence, risk factors and hepatitis B immunization: helping fill the gap on hepatitis B epidemiology among homeless people, Goiânia, Central Brazil. **Cadernos de saúde pública**, Rio de Janeiro v. 33, p. e00109216, Aug. 2017.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology letters**, London, v. 6, n. 3, p. 342-345, Jun. 2010.

CERISOLA, J. A.; CHABEN, M. F.; LAZZARI, J. O. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Prensa médica argentina**, Buenos Aires, v. 49, p. 1761-67, 1962.

CERISOLA, J.A. *et al.* Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. Boletín de la Oficina **Sanitaria Panamericana**, Washington, v. 73, p. 203-221, sep. 1972.

- CHAGAS, C. J. R. 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, 1909.
- CHANG, C. *et al.* Evaluation of a prototype *Trypanosoma cruzi* antibody assay with recombinant antigens on a fully automated chemiluminescence analyzer for blood donor screening. **Transfusion**, London, v. 46, n. 10, p. 1737-1744, Sep. 2006.
- 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.
- PIRARD, M. *et al.* The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region. **Transfusion**, London, v. 45, n. 4, p. 554-561, Jul. 2005.
- CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S4-S5, Jun. 2010.
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS Directiva 2006/17/CE da Comissão. **Jornal Oficial da União Europeia**, p.L 38/40, 2006.
- 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, 2009.
- COSTA, M. F. F. L. *et al.* Ageing with *Trypanosoma cruzi* infection in a community where the transmission has been interrupted: the Bambuí Health and Ageing Study (BHAS). **International Journal of Epidemiology**, London, v. 30, n. 4, p. 887-893, Aug. 2001.
- COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, Jun. 2010.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n. 3, p. 286-296, May./Jun. 2012.
- CUTRIM, F. S. *et al.* DC no Estado do Maranhão, Brasil: registro de casos agudos no período de 1994 a 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 6, p. 705-708, 2010.
- DALTRO, R. T. *et al.* Cross-reactivity using chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens: diagnostic performance in settings co-endemic for Chagas disease and American cutaneous or visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 57, n. 8, p. e00762-19, 2019.
- DA COSTA, G. C. V. *et al.* The identification and characterization of epitopes in the 30–34 kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of Chagasic patients. **Journal of proteomics**, Amsterdam, v. 80, p. 34-42, Mar. 2013.
- DA SILVA SOLCÀ, M. *et al.* Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. e103635, Jul. 2014.

DE CARLI, G.A. **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, Rio de Janeiro, 2001.

DE OLIVEIRA, F. J. N. **Anticorpos Anti-*Trypanosoma cruzi* como preditivos de infecção por *Leishmania infantum***, 2013. Tese - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

DEL CONO SUR, I. **VI Reunión de la Comisión Intergubernamental para la eliminación del *Triatoma infestans* y la interrupción de la tripanosomiasis americana transfusional**. Oficina Sanitaria Panamericana OPS/HCP/HCT97, Buenos Aires v. 91, 1993. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/XIII-REUNION-INCOSUR.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2019.

DEL-REI, R. P. *et al.* Detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies by chimeric antigens in chronic Chagas disease-individuals from endemic South American countries. **PloS one**, San Francisco, v. 14, n. 4, p. e0215623, Apr. 2019.

DIAS, E. *et al.* Um ensaio de profilaxia de moléstia de Chagas. **Imprensa Oficial**, Rio de Janeiro, p. 116, 1945.

DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 22, n. 3, p. 147-156, Jul./Sep. 1989.

DIAS, J. C.; SCHOLFIELD, C, J. Controle da transmissão transfusional da DC na Iniciativa do cone Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.31, n. 4, p 373 – 383, Jul./Aug. 1998.

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

DIAS JCP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. (Orgs). ***Trypanosoma cruzi e DC***. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 48-71 p.

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

DIAS, J.C.P. Globalização, iniquidade e DC. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, p. S13-S22, 2007.

DIAS, J. C. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, supl 1, p 41-45, Jul. 2009.

DIAS, J. C. *et al.* 2nd Brazilian Consensus on Chagas disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba**, v. 49, supl 1, p 7-86, 2016.

DOPICO, E. *et al.* Immune reactivity to *Trypanosoma cruzi* chimeric proteins for Chagas disease diagnosis in immigrants living in a non-endemic setting. **BMC infectious diseases**, London, v. 19, n. 1, p. 251, Mar. 2019.

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

- E SILVA, A. M. F. *et al.* Spatial prediction of risk areas for vector transmission of *Trypanosoma cruzi* in the State of Paraná, southern Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 10, p. e0006907, Oct. 2018.
- FEARON, M.A. *et al.* A case of vertical transmission of Chagas disease contracted via blood transfusion in Canada. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, Oakville, v. 24, n. 1, p. 32-34, 2013.
- FERRÃO, A. R. *et al.* Das Américas para o mundo: o desafio da globalização da DC. **Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical**, Lisboa, v. 12, p. 66-70, 2013.
- FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. M. Doença da Chagas. In: Ferreira AW, Avila SLM. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.241-249.
- FITARELLI, D. B.; HORN, J. F. Descarte de bolsas de sangue devido à reatividade para DC em um laboratório de triagem sorológica de doadores em Porto Alegre-RS. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 5, p. 310-314, 2009.
- FLORES-CHÁVEZ *et al.* Transfusional Chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. **Clinical Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 46, n. 5, p. e44-e47, 2008.
- FLORES-CHAVEZ, M. D. *et al.* Evaluation of the Elecsys Chagas assay for detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in a multicenter study in Europe and Latin America. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 56, n. 5, Apr. 2018.
- FREITAS, H. F. G. *et al.* Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. **International journal of cardiology**, Amsterdam, v. 102, n. 2, p. 239-247, Jul. 2005.
- GADELHA, A. Á. M. *et al.* Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test. **Vox sanguinis**, Basel, v. 85, n. 3, p. 165-170, 2003.
- GASCÓN, J. *et al.* Diagnosis, management, and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Sociedad Española de Cardiología**, Madrid, v. 60, n. 3, p. 285-293, Mar. 2007.
- GEISELER, P.J. *et al.* Fulminant Chagas' disease (CD) in bone marrow transplantation (BMT). In: **Interrscience conference on Antimicrobial Agents and chemotherapy**, 169 (Abstracts)
- GOMES, C. *et al.* American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 81, p. 81-84, Apr. 2019.
- GÓMEZ, L. A.; GUTIERREZ, F. R.S.; PEÑUELA, O. A. *Trypanosoma cruzi* infection in transfusion medicine. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 3, p. 262-267, Jul/Sep 2019.
- GOMES, Y. M. *et al.* Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 4, p. 497-501, May. 2001.

GOMES, Y. M.; LORENA, V.; 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, p. 115-121, 2009.

GONZALEZ, A. *et al.* Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 81, n. 11, p. 3356-3360, Jun. 1984.

GRANT, I. H. *et al.* Transfusion-associated acute Chagas acquired in the States. **Annals of Inter Medicine**, Boston, v. 111, p. 849-851, 1989.

GUERRI-GUTTENBERG, R. A. *et al.* Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared!. **European heart journal**, London, v. 29, n. 21, p. 2587-2591, Nov. 2008.

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, 2013.

GUZMÁN-GÓMEZ, D. *et al.* Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. **Parasites & vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 1-8, Sep. 2015.

HABERLAND, A. *et al.* Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, Berlin, v. 51, n. 2, p. 271-294, Feb. 2013.

HAMERSCHLAK, N. *et al.* Chagas' disease: an algorithm for donor screening and positive donor counseling. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 205-209, 1997.

HOLGUÍN, A. *et al.* Dried blood as an alternative to plasma or serum for *Trypanosoma cruzi* IgG detection in screening programs. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 20, n. 8, p. 1197-1202, Aug. 2013.

HOARE, R. *et al.* Development, characterisation and application of monoclonal antibodies for the detection and quantification of infectious salmon anaemia virus in plasma samples using luminex bead array technology. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. e0159155, Jul. 2016.

HUBSCH, R. M. *et al.* El ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas: I. Estudio comparativo de dos preparaciones antigénicas de *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p. 277-85, 1988.

JÚNIOR, S. *et al.* Análise espaço-temporal da DC e seus fatores de risco ambientais e demográficos no município de Barcarena, Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 20, p. 742-755, 2017.

IBIRONKE, O. *et al.* Validation of a new test for *Schistosoma haematobium* based on detection of Dra 1 DNA fragments in urine: evaluation through latent class analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. e1464, Jan. 2012.

IMMIGRATION BUREAU, M.O.J., Government of Japan, 2006. **Registration of Foreign Residents**. Disponível em: < <http://www.moj.go.jp/ENGLISH/IB/ib-01.html>. >. Acesso em 07 may. 2019.

- KERNNDT, P.R. *et al.* Prevalence of antibody to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Los Angeles, California. **Transfusion**, v. 31, p. 814-818, 1991.
- KIPNIS, T. L. *et al.* Estudo imunobiológico de estoques de *Trypanosoma cruzi* isolados de pacientes na fase aguda da DC. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 16, n. 4, p. 175-183, 1983.
- KROPF, S. P. **DC, doença do Brasil: ciência, saúde e nação, 1909-1962**. SciELO - Editora FIOCRUZ, 2009.
- KULLER, L. *et al.* Development of a whole-virus multiplex flow cytometric assay for antibody screening of a specific pathogen-free primate colony. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 53, n. 3, p. 185-193, Nov. 2005.
- 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.
- LAKOS, Gabriella *et al.* Analytical and clinical comparison of two fully automated immunoassay systems for the diagnosis of celiac disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, Mar. 2014.
- LANGHI, D. M. *et al.* The application of latent class analysis for diagnostic test validation of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 6, n. 4, p. 181-187, Aug. 2002.
- LAPA, J. S. *et al.* Dealing with initial inconclusive serological results for chronic Chagas disease in clinical practice. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, Berlin, v. 31, n. 6, p. 965-974, 2012.
- LAZZARI, C. R.; PEREIRA, M. H.; LORENZO, M. G. Behavioural biology of Chagas disease vectors. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, p. 34-47, 2013.
- LEIBY, D. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* in a low-to moderate-risk blood donor population: seroprevalence and possible congenital transmission. **Transfusion**, London, v. 39, n. 3, p. 310-315, 1999.
- LEE, B.Y. *et al.* Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet infectious diseases**, New York v. 13, n. 4, p. 342-348, 2013.
- LEONY, M. L. *et al.* Performance of recombinant chimeric proteins in the serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 13, n. 6, p. e0007545, 2019.
- LIDANI K. C. F. *et al.* The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 607, 2017.
- LISSALDO, A. M. *et al.* Alkaline soluble *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigen (ASEA) applied to Dot-ELISA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 163-166, Mar./Apr. 1994.

- LIU, Y. *et al.* Rapid diagnostic test performance assessed using latent class analysis for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* placental malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 95, n. 4, p. 835-839, Oct. 2016.
- LORCA, M. *et al.* Evaluation of commercially available reagents for diagnosis of Chagas disease in Chilean blood banks. I. Selection of reagents. **Revista Medica de Chile**, Santiago, v. 120, n. 4, p. 420-426, 1992.
- LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. (eds.). *Trypanosoma cruzi* e DC. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p. 344-78.
- LUQUETTI, A. O.; SCHMUÑIS, G. A. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. In: American Trypanosomiasis. Elsevier, p. 743-792, 2010.
- MAHLER, Michael *et al.* Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 38, n. 1, p. 14-20, Nov. 2016.
- MARCILLA, A. *et al.* The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 18, n. 1, p. 136-142, 2001.
- MARIN-NETO, J. A. *et al.* Forma indeterminada da moléstia de Chagas. Proposta de novos critérios de caracterização e perspectivas de tratamento precoce da cardiopatia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 79, n. 6, p. 623-627, 2002.
- MAZZA, S. *et al.* Transmisión de “*Schizotrypanum cruzi*” al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. **Mepra, Guión Ediciones**, v. 28, p. 41-46, 1936.
- MELO, A. S. *et al.* The prevalence of Chagasic infection among blood donors in the State of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 69-73, 2009.
- MENDES, R. S. *et al.* Aspectos epidemiológicos da DC canina no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 12, p. 1459-1465, 2013.
- MIGUEL, C. B. *et al.* Chagas Disease and Transfusion Transmission: A Review. **SM Tropical Medicine Journal**, Dover, v. 2, 2017.
- MIRANDA, D. L. P. *et al.* Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among blood donors in the state of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio De Janeiro, v. 52, 2019.
- MONCAYO, A.; LUQUETTI, A. O. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 489-495, 1990.
- MONCAYO, A. Chagas disease: Epidemiology and and prospects for interruption of transmission in the Americas. **World health Statistics Quarterly.**, v. 45, p. 276-279, 1992.

- MORAES-SOUZA, H. *et al.* **Estudo do metabolismo e viabilidade do sangue fresco e preservado tratado pela violeta de genciana**. 1985. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- MORAES-SOUZA, H. *et al.* Significado dos testes sorológicos positivos e indeterminados para DC na triagem dos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberaba. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 105-109, 2006.
- MORAES-SOUZA, H. *et al.* Perfil sorológico para DC dos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberaba. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 2, p. 110-114, 2006.
- MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. O controle da transmissão transfusional. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. supl. 2, p. 64-67, 2011.
- MONTANARO, V. V. A. *et al.* Epidemiology of concurrent Chagas disease and ischemic stroke in a population attending a multicenter quaternary rehabilitation network in Brazil. **Neurological Sciences**, Bornova, v. 40, n. 12, p. 2595-2601, Dec. 2019.
- MUCCI, J. *et al.* Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 11, n. 10, p. e0005972, Oct. 2017.
- MUÑOZ, J. *et al.* Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease. **Acta Tropica**, Basel, v. 48, p. 1736-1740, Jul. 2009.
- MUÑOZ-SARAVIA, S. G. *et al.* Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart failure reviews**, Norwell, v. 17, n. 1, p. 45-64, Jan. 2012.
- NASCIMENTO, P. P. *et al.* Perfil epidemiológico dos marcadores sorológicos para vírus da hepatite B dos pacientes atendidos em um laboratório público. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 10, p. 495-498, 2012.
- NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STANDARDS AND CONTROL: WHO **International Standard 1st International Standard for Chagas**. Disponível em: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/09-186.pdf>. Acesso em: 16 jun de 2019.
- NETO, V.A. *et al.* Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Medicina**, Porto Alegre, v. 79, n. 1, p. 12-26, 2000.
- NEVES, D. P. Parasitologia humana. In: Parasitologia humana. 2002. cap 11, p. 85-91.
- NICKERSON, P. *et al.* Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. **Annals of internal Medicine**, Philadelphia, v. 111, n. 10, p. 8521-853, 1989.
- NISHIMURA, A. *et al.* An autopsy case of sudden death due to Chagas' disease. **Nihon Hoigaku Zasshi**, Tokyo, v. 51, n. 1, p. 39-43, 1997.
- NISIDA, I. V. V.; AMANTO-NETO, V. Estudo descritivo da avaliação da transmissão congênita da DC em três Instituições da cidade de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio De Janeiro, v. 32, n. 1, p. 79-80, 1999.

NUNES, M. C. P. *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, 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, Jul. 1999.

OLIVEIRA, G. M. *et al.* Systematic review of diagnostic tests accuracy: a narrative review. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 153-156, 2010.

OLIVEIRA, L. R. *et al.* Reativação da DC com envolvimento do sistema nervoso central durante o tratamento de linfoma não Hodgkin. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 269-272, 2010.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Second WHO consultation on the development of a WHO reference panel for the control of Chagas diagnostic testes.** Geneva, 2007.

Disponível em:

https://www.who.int/bloodproducts/ref_materials/WHO_Report_1st_Chagas_BRP_consultation_7-2007_final.pdf. Acesso em: 07 mai. 2019.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Folheto informativo da DC (tripanosomíase americana). OMS, Genebra, Suíça, 2017.** Disponível em:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em: 11 jul. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Chagas disease (American trypanosomiasis). Genève: [s.n.], 2019.** Disponível em: [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/Chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/Chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 07 may. 2019.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANDA DA SAÚDE. **Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas.** OPS/HDM/CD/425-06, 2006.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANDA DA SAÚDE. **Información general: Enfermedad de Chagas. Washington, 19 set. 2016.** Disponível em:

<https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856&Itemid=41506&lang=es> . Acesso em: 03 aug. 2018.

OTANI, M. M. **Programa de avaliação externa para os testes de triagem sorológica de doadores de banco de sangue dos centros de referência da América Latina: utilização de multipainel específico. 2003.** Tese de Doutorado. PhD thesis. University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

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

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, 1992.

PELLEGRINO, A. **Migration from Latin America to Europe: trends and policy challenges**. IOM Migration Research Series, 2004.

PEREIRA, F. M. **Taxa de infecção do vírus linfotrópico de células humanas (HTLV), vírus da hepatite C (HCV), coinfeção HTLV/HCV no Estado da Bahia e impacto da coinfeção HTLV/HCV no perfil de citocinas. 2019**. Tese de Doutorado. Instituto Gonçalo Moniz.

PEREIRA, V. R. A. *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, 2005.

PEREZ, C. J.; LYMBERG, A.J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of Chagas disease: implications for global health. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 11, p. 595-603, 2015.

PÉREZ-MOLINA, J. A., MOLINA, I. DC. **The Lancet**, London, v. 391, n. 10115, p. 82-94, Jun. 2018.

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

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

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, 2011.

PRINZI, A. **Why Pretest and Posttest Probability Matter in the Time of COVID-19**. **American society for microbiology, 2020**. Disponível em: <https://www.asm.org/Articles/2020/June/Why-Pretest-and-Posttest-Probability-Matter-in-the>. Acesso: 11 de jul de 2020.

RASSI A. J.; RASSI, S. G.; RASSI, A. Sudden death in Chagas' disease. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 86-96, 2001.

RASSI, A. *et al.* Clinical phases and forms of Chagas disease. In: American Trypanosomiasis. **Elsevier**, p. 709-741, 2010.

- RASSI, A. J.; RASSI A.; MARCONDES, R. J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious disease clinics of North America**, Philadelphia, v.26, n. 2, p. 275-291, 2012.
- REICHE, E. M. V. *et al.* DC congênita: epidemiologia, diagnóstico laboratorial, prognóstico e tratamento. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 3, p.125-132, 1996.
- REPOLÊS, L. C. **Avaliação do método confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1 no esclarecimento diagnóstico e na monitoração sorológica para DC em bancos de sangue.** 2014. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Rene Rachou.
- REMESAR, M. C. *et al.* Estimation of sensitivity and specificity of several *Trypanosoma cruzi* antibody assays in blood donors in Argentina. **Transfusion**, Washington, v. 49, n. 11, p. 2352-2358, 2009.
- RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. Forma indeterminada da DC: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 31, n.3, p. 301-314, 1998.
- RUSSOMANDO, G. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Polymerase Chain Reaction-Based Detection in Dried Feces of *Triatoma infestans*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 83, n. 1, p. 62-66, 1996.
- SABINO, E. C. *et al.* Enhanced classification of Chagas serologic results and epidemiologic characteristics of seropositive donors at three large blood centers in Brazil. **Transfusion**, Washington, v. 50, n. 12, p. 2628-2637, 2010.
- SACKETT, D. L, STRAUS S. On some clinically useful measures of the accuracy of diagnostic tests. **American Society of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 129, p. A17, Sep. 1998.
- SAEZ-ALQUÉZAR, A. *et al.* Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA Chagas. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 38, n. 2, p. 851-854, fev. 2000.
- SANCHES, T. **Um guia global para a DC.** Boletim n. 2037, 2018. Disponível em: <https://ufmg.br/comunicacao/publicacoes/boletim/edicao/2037/um-guia-global-para-a-doenca-de-Chagas>.
- SALLES, N. A. *et al.* Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. **Pan American Journal of Public Health**, v. 13, p 2-3, 2003.
- SANGENIS, L. H. C. *et al.* First report of acute Chagas disease by vector transmission in Rio de Janeiro state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 361-364, 2015.
- SANTOS, L. S. *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**, Uberaba, v. 45, n. 1, p. 35-44, 2012.
- SANTOS, E. F. *et al.* Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 14, n. 8, p. e0008445, 2020.

- SANTOS, F. L. *et al.* Chronic Chagas disease diagnosis: A comparative performance of commercial enzyme immunoassay tests. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p 1034-9, 2016a.
- SANTOS, F. L. *et al.* Performance assessment of four chimeric *T. cruzi* antigens based on antigen-antibody detection for diagnosis of chronic Chagas disease. **PLoSOne, San Francisco**, v. 11, p e0161100, Aug. 2016b.
- SANTOS, F. L. *et al.* Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic Chagas disease - a Phase II study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, p e0005433, 2017a.
- SANTOS, F. L. *et al.* Performance assessment of a *T. cruzi* chimeric antigen in multiplex liquid microarray assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 55, p 2934-45, 2017b.
- SANTOS, F. L. *et al.* Highly accurate chimeric proteins for the serological diagnosis of chronic Chagas disease: A latent class analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 99, n. 5, p. 1174-1179, 2018.
- SAYAMA, Y. *et al.* Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among at-risk blood donors in Japan. **Transfusion**, Arlington, v. 53, 287-294, 2019.
- SCHOFIELD, C. J. The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 69, n. 3, p. 363-379, 1979.
- 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. Bio systematics and evolution of the Triatominae. **Cadernos de saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 16, p. S89-S92, 2000.
- SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 583-588, Dec. 2006.
- SCHMUNIS, G. A.; CRUZ, J. R. Safety of the blood supply in Latin America. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 1, p. 12-29, 2005.
- SCHMUNIS, G.A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, Arlington, v. 31, p 547-557, 1991.
- SCHENONE, H. *et al.* Infección chagásica congénita de segunda generación. **Boletín chileno de parasitología**, Santiago, v. 42, n. 3/4, p. 71-3, 1987.
- SCHUMACHER, S. G. *et al.* Diagnostic test accuracy in childhood pulmonary tuberculosis: a Bayesian latent class analysis. **American journal of epidemiology**, Baltimore, v. 184, n. 9, p. 690-700, 2016.
- SECRETARIA DO ESTADO. **Boletim Epidemiológico de DC, Nº 01 – 2019, 2020.**
Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2019-Boletim-epidemiol%C3%B3gico-Doen%C3%A7as-de-Chagas-n.-01-3.pdf>. Acesso em: 01 de mai de 2020.

- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral Transmission of Chagas Disease. **Clinical infectious diseases**, Philadelphia, v. 54, n. 6, p.845-852, 2012.
- SILVA, A. A. O. *et al.* Performance of *Treponema pallidum* recombinant proteins in the serological diagnosis of syphilis. **Plos one**, San Francisco, v. 15, n. 6, p. e0234043, Jun. 2020.
- SILVA, E.D. Desenvolvimento de ensaio multiplex para diagnóstico da DC utilizando plataformas de testes rápidos. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - **Fundação Oswaldo Cruz**, Curitiba-PR, Brasil, 2016.
- SILVA, E. D. *et al.* Development of a New Lateral Flow Assay Based on IBMP-8.1 and IBMP-8.4 Chimeric Antigens to Diagnose Chagas Disease. **BioMed Research International**, New York, v. 2020, 2020.
- RODRÍGUEZ, A. F. *et al.* Analysis of clinical decisions. **Medicina clínica**, Fidenza, v. 94, n. 9, p. 348-354, Mar. 1990.
- SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e transmissão vetorial da DC no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio De Janeiro, v. 27, p. 11-22, 1994.
- SILVEIRA, A. C.; VINHAES, M. C. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, sup. 1 p. 405- 411, 1999.
- SILVEIRA, J. F.*et al.* Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 286-291, 2001.
- SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v: 44, supl.2, 2011.
- SILVEIRA, A. C. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. supl. 2, p. 122-124, 2011.
- SOUZA, H. M.; RAMIREZ, L. E.; BORDIN, J. O. DC transfusional: Medidas de controle. In: DIAS, J.C.P, COURA, J.R. Clínica e Terapêutica da DC: uma abordagem prática para o clínico geral. **Editora da Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, p. 411-428, 1997.
- SWETS, J. A. Measuring the accuracy of diagnostic systems. **Science**, New York, v. 240, n. 4857, p. 1285-1293, 1988.
- TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. Problemática vetorial da DC. **Arquivos de Ciências da Saúde**, São José do Rio Preto, v. 11, n. 1, p. 44-47, 2004.
- TEIXEIRA, R. B.; DE OLIVEIRA, S. M. C. Perfil de pacientes portadores de DC em Rio Branco, Acre, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 262-265, 2015.
- TOBLER, L. H. *et al.* Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Chagas antibody in US blood donors. **Transfusion**, Arlington, v. 47, n. 1, p. 90-96, Dec. 2007.

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, 1996.

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.

VILALBA, R. *et al.* Acute Chagas' disease in recipient of a Bone Marrow transt in Spain. **Clinical e Infectious Diseases**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 594-595, 1992.

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, 1995.

VERGARA, U. *et al.* Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 29, n. 9, p. 2034-2037, 1991.

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.

VRAY, M. **Cours Évaluation des Tests Diagnostiques: les 3/4 phases de développement d'un test diagnostique.** Instituto Pasteur, Paris, 2015.

WANG, T.; XINGXIANG, L. I. **Chemiluminescent methods and reagents for analyte detection.** U.S. Patent n. 9,399,657, 26, 2016.

WESTPHALEN, E. V. N.; BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da DC no Continente Americano. BEPA. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 9, n. 105, p. 18-35, 2012.

WHITMAN, J. D. *et al.* Chagas disease serological test performance in US blood donor specimens. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 57, n. 12, Dec. 2019.

ZINGALES, B. *T. cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta tropica*, Amsterdam, v. 184, p. 38-52, 2018.

ZUNA, A.; DE-MUYNCK, A. **Sensibilidad y especificidad de las pruebas serologicas de la enfermedad de Chagas.** In: Romero A, Enfermedad de Chagas, Cochabamba. Bolivia La Paz, 1979. 309-318 p.

APÊNDICE A

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: FRED LUCIANO NEVES SANTOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67809417.0.0000.0040

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

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.209.976

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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

Objetivo Secundário:

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

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121

Bairro: Candeal

CEP: 40.296-710

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3176-2327

Fax: (71)3176-2285

E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

TRANSFUSION

Performance of a chemiluminescence immunoassay analyzer (CLIA) for Chagas disease serological screening in blood bank

Journal:	<i>Transfusion</i>
Manuscript ID	Trans-2020-1077
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	24-Nov-2020
Complete List of Authors:	Santos, Emily; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Advanced Public Health Laboratory Leony, Leonardo; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Advanced Public Health Laboratory Silva, Ângelo; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Advanced Public Health Laboratory Daltro, Ramona; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Advanced Public Health Laboratory Freitas, Natália; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Advanced Public Health Laboratory Vasconcelos, Larissa; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Advanced Public Health Laboratory Araújo, Fernando; HEMOBA Celedon, Paola; Instituto de Biologia Molecular do Paraná Krieger, Marco; Instituto Carlos Chagas, Laboratório de Genômica Funcional Zanchin, Nilson; Instituto Carlos Chagas, Laboratório de Genômica Funcional Santos, Fred; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Advanced Public Health Laboratory
Key words:	Infectious Disease Testing, Transfusion-transmitted Disease - Other