



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DO *TRYPANOSOMA*
***CRUZI* NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS EM CÃES**

LEONARDO MAIA LEONY

Salvador - Bahia

2019

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DO *TRYPANOSOMA
CRUZI* NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS EM CÃES**

LEONARDO MAIA LEONY

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

Salvador - Bahia

2019

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

L586a Leony, Leonardo Maia.
Avaliação e validação de proteínas quiméricas do *Trypanosoma cruzi* no diagnóstico da doença de Chagas em cães, Brasil / Leonardo Maia Leony. - 2019. 93f. : il. ; 30 cm.

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

Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Doença de Chagas. 2. ELISA. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Cães. 5. Antígenos. I. Título.

CDU 616.937

AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI* NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS EM CÃES

LEONARDO MAIA LEONY

Folha de Aprovação

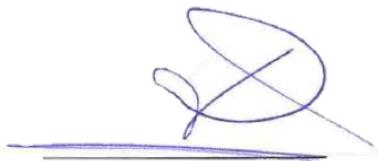
Comissão Examinadora



Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira
Pesquisador Associado IGM/FIOCRUZ



Dra. Manuela da Silva Solcà
Professora Adjunta do curso de Medicina
Veterinária da UFBA



Dra. Fernanda Washington de Mendonça Lima
Professora Titular da Faculdade de Farmácia da UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Aperfeiçoamento 001”

IGM – Fiocruz - BA

FAPESB

AGRADECIMENTOS

Esta é a parte mais desafiante de dissertar, já que relações humanas não são regidas por medidas quantitativas, não há valor de significância e não pode ser analisado por sensibilidade ou especificidade. Os atributos das relações humanas são qualitativos, a interpretação é subjetiva e unicamente do observador, não há como fazer uma regressão linear para determinar os valores dos atributos das relações e contribuições, mas farei o melhor, há muitas pessoas às quais eu gostaria de estender os meus agradecimentos.

Primeiramente, gostaria de dedicar este trabalho à todas as vítimas da doença de Chagas, suas famílias e amigos. Gostaria de pedir desculpas a estes por não termos ainda uma solução definitiva para esta doença, mesmo tendo sido descoberta há mais de 100 anos. A comunidade científica carece profundamente de atenção, investimentos e pesquisas científicas são consideravelmente dispendiosas.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Fred Santos, pela inexorável paciência, por ser um exemplo de respeito, resiliência, integridade e humildade. Considerando uma distribuição padrão de qualidade de orientação, Dr. Fred está ao menos 5σ , 5 desvios padrões à direita da excelência. Gostaria de agradecer aos professores e servidores da biblioteca do Instituto Gonçalo Moniz, pelo espaço e pela ajuda catalográfica. Estendo os meus agradecimentos aos meus professores do Laboratório Avançado de Saúde Pública, Professor Carlos Silva e a Professora Fernanda Grassi, aos meus colegas de laboratório, especialmente Ângelo Silva, Emily Ferreira, Natália Erdens, Ramona Daltro, meus colegas do Instituto, Gilmar Ribeiro, Beatriz Dias, das Instituições parceiras e aos nossos colaboradores, em especial aos nossos colegas da Fiocruz Paraná, do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, da Fiocruz Pernambuco, do Instituto Aggeu Magalhães e da Universidade Federal de Ouro Preto.

Gostaria de agradecer à minha família, meus pais Ticiano e Eugênia Leony, minhas irmãs Letícia e Larissa, meu namorado Everton Lima, pelas palavras de conforto e pelo amor incondicional.

Gostaria de agradecer ao meu avô Joel Leony, que não está mais conosco, ao meu tio-avô Bernardo e meu irmão Milton, que me inspiraram a seguir a carreira científica ao deixar claro que a ciência é o motor da prosperidade.

“Nossa paixão em aprender
é a nossa ferramenta de sobreviver.”

“Organizamos uma civilização global na qual os elementos mais cruciais dependem profundamente da ciência e da tecnologia. Também organizamos coisas para que quase ninguém entenda sobre ciência e tecnologia. Esta é uma receita para o desastre. Podemos nos livrar disso por um tempo, mas, mais cedo ou mais tarde, essa mistura combustível de ignorância e poder explodirá em nossas caras.”

“A ciência é muito mais do que um corpo de conhecimento. É uma maneira de pensar. E isso é fundamental para o nosso sucesso. A ciência nos convida a aceitar os fatos, mesmo quando eles não estão de acordo com nossos preconceitos. Ela nos aconselha a levar hipóteses alternativas à nossas cabeças e ver quais são as que melhor correspondem aos fatos. Impõe-nos um equilíbrio perfeito entre a abertura sem obstáculos a novas ideias, por mais heréticas que sejam, e o mais rigoroso escrutínio cético de tudo – estabelecendo novas ideias e sabedoria. Precisamos da ampla apreciação desse tipo de pensamento. Funciona. É uma ferramenta essencial para uma democracia em uma era de mudança. Nossa tarefa não é apenas treinar mais cientistas, mas também aprofundar a compreensão pública da ciência.”

Prof. Carl Edward Sagan, Ph. D.

★ 09/09/1934 - † 20/12/1996

LEONY, Leonardo Maia. Avaliação e validação de proteínas quiméricas do *Trypanosoma cruzi* no diagnóstico da doença de chagas em cães, Brasil. 2019. 110 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os cães domésticos são considerados animais sentinela e reservatórios para doença de Chagas (DC), devido ao seu papel na manutenção do ciclo de transmissão em ambientes domésticos e sua correlação com a prevalência da DC humana. O ELISA indireto é geralmente a metodologia escolhida para o diagnóstico, no entanto, seu desempenho depende substancialmente dos antígenos empregados. Uma estratégia para ultrapassar esta limitação é utilizando antígenos quiméricos, compostos por sequências peptídicas antigênicas, imunodominantes, conservadas e repetitivas de múltiplas proteínas do parasita. Por isto, o nosso grupo desenvolveu quatro antígenos quiméricos (IBMP-8.1, 8.2, 8.3 e 8.4), seu potencial diagnóstico foi avaliado para o diagnóstico da DC humana, no qual os antígenos quiméricos apresentaram um desempenho diagnóstico superior em comparação aos dos testes comercialmente disponíveis no Brasil, Espanha e Argentina. **OBJETIVO:** Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade sorodiagnóstica dos antígenos IBMP frente às amostras de cães naturalmente e experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Os ensaios foram otimizados por *checkerboard titration*. Posteriormente, o potencial diagnóstico foi validado através de curvas ROC e o desempenho dos testes foi determinado utilizando tabelas de dupla entrada. A reatividade cruzada também foi avaliada para babesiose, erliquiose, dirofilariose, anaplasmosse e leishmaniose. **RESULTADOS:** Todos os antígenos quiméricos demonstraram um alto desempenho diagnóstico, especialmente o IBMP-8.3 e IBMP-8.4. O antígeno IBMP-8.3 demonstrou uma sensibilidade de 100%, seguido pelo IBMP-8.4 (96.7% - 100%), IBMP-8.2 (73.3% - 87.5%) e IBMP-8.1 (50% - 100%). As especificidades mais elevadas dos antígenos foram para o IBMP-8.2 (100%) e IBMP-8.4 (100%), seguido por IBMP-8.3 (96.7% - 97.5%) e IBMP 8.1 (89.1% -100%). **CONCLUSÕES:** Portanto, o uso de antígenos quiméricos em imunoenaios para diagnosticar a DC em cães é uma ferramenta promissora para fins veterinários e epidemiológicos. O uso de antígenos quiméricos apresentou uma maior resistência à problemas comuns observados no diagnóstico sorológico de DC, especialmente em relação à variação dos parâmetros de eficiência de acordo com a cepa do parasita e reatividade cruzada com outras doenças parasitárias.

Palavras-chave: ELISA, doença de Chagas, cães, *Trypanosoma cruzi*, Antígenos recombinantes quiméricos.

LEONY, Leonardo Maia. Evaluation and validation of *Trypanosoma cruzi* chimeric antigens for the diagnosis of Chagas' Disease in dogs, Brazil. 2019. 110 f. il. Dissertation (Master of science) – Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Dogs are considered a sentinel group for Chagas disease, due to their role in maintaining the transmission cycle in domestic environments and their correlation with humans' Chagas prevalence. ELISA is the generally chosen methodology for diagnosis, however, its performance depends substantially on the employed antigenic matrix. A strategy to overcome this limitation is by utilizing chimeric antigens, consisting of antigenic, immunodominant, conserved and repeating amino acid sequences of the parasite. As such, our group developed four chimeric antigens (IBMP-8.1, 8.2, 8.3 and 8.4) and their diagnostic potential was previously evaluated for human's diagnosis, in which the chimeric antigens presented a superior diagnostic performance compared to commercially available tests in Brazil, Spain, and Argentina. **OBJECTIVE:** This study aimed to evaluate the potential diagnostic ability of these antigenic proteins for *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. **MATERIALS AND METHODS:** The assays were optimized by checkerboard titration. Subsequently, the diagnostic potential was validated through ROC curves and the tests performance was determined using double entry tables. Cross-reactivity was also evaluated for babesiosis, ehrlichiosis, dirofilariasis, anaplasmosis and leishmaniasis. **RESULTS:** All chimeric antigens demonstrated a high diagnostic performance, especially IBMP-8.3 and IBMP-8.4. IBMP-8.3 antigen demonstrated a 100% sensitivity, followed by IBMP-8.4 (96.7% - 100%), IBMP-8.2 (73.3% - 87.5%), and IBMP-8.1 (50% - 100%). The highest specificities of the antigens were for IBMP-8.2 (100%) and IBMP-8.4 (100%), followed by IBMP-8.3 (96.7% - 97.5%) and IBMP 8.1 (89.1%-100%). **CONCLUSIONS AND STUDY CONTRIBUTIONS:** Therefore, the use of chimeric antigenic matrices in immunoassays to diagnose CD in dogs is a highly promising tool for veterinary and epidemiological purposes. The use of chimeric antigens also efficiently addressed the common hurdles seen in CD serodiagnosis, especially regarding variation in efficiency parameters according to parasite's strain and cross-reactivity with other infectious diseases.

Keywords: ELISA, Chagas disease, Dog, *Trypanosoma cruzi*, Recombinant chimeric antigens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática da variação na expressão de famílias de antígenos de acordo com diferentes DTUs.....	21
Figura 2	Desenho esquemático das formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> e suas organelas.....	23
Figura 3	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> em hospedeiros vertebrados e em triatomíneos.	24
Figura 4	Achados clínicos e laboratoriais da doença de Chagas aguda em cães.....	26
Figura 5	Desenho esquemático do procedimento de ELISA indireto.....	29
Figura 6	Rotas migratórias de indivíduos portadores da doença de Chagas de áreas endêmicas para países não endêmicos.....	30
Figura 7	Distribuição mundial das DTUs do <i>Trypanosoma cruzi</i> circulantes em animais (domésticos e silvestres) e humanos.....	32
Figura 8	Ilustração da intercalação dos ciclos e DTUs entre os ciclos doméstico, silvático e peridoméstico de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> no Brasil.....	33
Quadro 1	Detalhamento dos ensaios sorológicos utilizados para determinação da DC em cães em estudos de corte-transversal.....	37
Quadro 2	Composição dos antígenos recombinantes IBMP.....	38
Figura 9	Determinação das condições aceitáveis para a padronização dos testes de ELISA indireto usando os antígenos IBMP.....	50
Figura 10	Combinação binária entre os prováveis resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.....	52
Figura 11	SDS-PAGE dos antígenos IBMP.....	55
Figura 12	Painel sorológico das amostras utilizadas para avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos IBMP.....	57
Figura 13	Análise gráfica dos valores médios de absorbância do antígeno IBMP-8.1.....	59
Figura 14	Análise gráfica dos valores médios de absorbância do antígeno IBMP-8.2.....	60
Figura 15	Análise gráfica dos valores médios de absorbância do antígeno IBMP-8.3.....	61
Figura 16	Análise gráfica dos valores médios de absorbância do antígeno IBMP-8.4.....	62
Figura 17	Índices de reatividade e parâmetros de desempenho diagnóstico obtidos com amostras de soro de cães infectados e não infectados pelo <i>T. cruzi</i>	64

Figura 18	Índices de reatividade dos antígenos IBMP frente às amostras de cães experimentalmente infectados com diferentes cepas distintas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
Figura 19	Análise gráfica da reatividade cruzada das proteínas quiméricas IBMP frente ao soro de cães infectados com outras doenças infecto-parasitárias.....	68
Figura 20	Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de famílias de genes ortólogos entre cinco espécies de protozoários da classe Kinetoplastida.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao antígeno IBMP-8.1.....	47
Tabela 2	Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao antígeno IBMP-8.2.....	48
Tabela 3	Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao antígeno IBMP-8.3.....	49
Tabela 4	Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao antígeno IBMP-8.4.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acu	Acurácia
ALTA	Detecção de anticorpos anti-tripomatigota 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>)
-BA	Bahia
BR	Brasil
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumine</i>)
C	Cães
CL	Chile
CO	Ponto de corte (<i>Cut-off</i>)
CR	Costa Rica
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
DTU	Unidade de tipagem discreta (<i>Discrete Typing Unit</i>)
ELISA/EIA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
Esp	Especificidade
Exa	Exatidão
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FN	Falso-negativo
FP	Falso-positivo
GD	Granada
GF	Guiana Francesa
H	Humanos
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>)

HRP	Peroxidase de rabanete (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humanas (<i>Human T-cell lymphotropic virus</i>)
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
IC	Imunocromatografia
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL	Interleucina
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IR	Índice de reatividade
kDNA	DNA do cinetoplasto (<i>Kinetoplast DNA</i>)
LABTRIP	Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos
LASP	Laboratório Avançado de Saúde Pública
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
MM	Marcador de peso molecular
MX	México
n	Número amostral
Na ₃ PO ₄	Fosfato de sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
ND	Informação não disponível
NDo	Número de indivíduos doentes
NEG	Amostras negativas para <i>Trypanosoma cruzi</i>
NSa	Número de indivíduos sadios
OMS	Organização Mundial da Saúde
P0	Probabilidade observada
PA	Panamá
-PA	Pará
PBS	Tampão fosfato-salina
PBS-Tween	Tampão fosfato-Tween 20 (<i>Phosphate buffered saline-Tween</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)

-PE	Pernambuco
PE	Peru
Pe	Probabilidade esperada
-PI	Piauí
POS	Amostras positivas para <i>Trypanosoma cruzi</i>
-RJ	Rio de Janeiro
ROC	Característica de Operação do Receptor (<i>Receiver operating characteristic</i>)
-SC	Santa Catarina
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
Sen	Sensibilidade
SFB	Soro fetal bovino
TcN	Amostras negativas para <i>Trypanosoma cruzi</i>
TcP	Amostras positivas para <i>Trypanosoma cruzi</i>
TMB	Tetra-metil-benzidina
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis fator</i>)
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
US/EUA	Estados Unidos da América
VN	Verdadeiro negativo
VP	Verdadeiro positivo
WB	<i>Western blot</i>
\bar{X}	Média aritmética

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μg	Micrograma
μl	Microlitro
° C	Graus Celsius
kDa	Quilodaltons
mg	miligrama
min	Minuto
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
κ	Kappa de Cohen

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	20
2.2	BIOLOGIA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
2.3	VIAS DE TRANSMISSÃO	23
2.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	24
2.4.1	A doença de Chagas aguda	25
2.4.2	A doença de Chagas crônica	26
2.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	27
2.6	EPIDEMIOLOGIA.....	29
2.7	A DOENÇA DE CHAGAS E OS CÃES	33
2.8	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DC EM CÃES	36
2.9	ANTÍGENOS IBMP	38
3	OBJETIVOS PROPOSTOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	41
4.2	LOCAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E PROCEDIMENTOS.....	41
4.3	OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES	41
4.4	ANÁLISE DA INTEGRIDADE MOLECULAR ATRAVÉS DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE).....	42
4.5	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO INICIAL DOS PAINÉIS SOROLÓGICOS.....	42
4.6	DEFINIÇÃO DO PADRÃO-OURO.....	43
4.7	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	44
4.8	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	44
4.9	CARACTERIZAÇÃO DO PAINEL AMOSTRAL.....	45
4.9.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	45
4.9.2	Gold Elisa Chagas® adaptado	45
4.9.3	ELISA in-house LABTRIP (lisado de <i>Trypanosoma cruzi</i>)	47
4.9.4	Teste rápido para leishmaniose	48
4.10	DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL.....	48
4.11	PADRONIZAÇÃO DO ELISA IBMP INDIRETO.....	48

4.12	EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS	50
4.12.1	Normalização dos dados	50
4.12.2	Cálculo do índice Kappa	51
4.12.3	Definição do ponto de corte (CO - <i>cut-off</i> e AUC).....	51
4.12.4	Avaliação dos parâmetros de desempenho	51
4.12.5	Testes estatísticos	54
4.13.1	Estudo de fase I	54
4.13.2	Reações cruzadas	54
5.1	ANÁLISE DA INTEGRIDADE MOLECULAR ATRAVÉS DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)	55
5.2	CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL.....	56
5.3	PADRONIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO IBMP-ELISA INDIRETO	58
5.4	ESTUDO DE FASE I.....	63
6	DISCUSSÃO	69
6.1	CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL.....	69
6.2	PADRONIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO IBMP-ELISA INDIRETO	73
6.3	ESTUDO DE FASE I.....	74
6.4	REATIVIDADE CRUZADA.....	77
7	CONCLUSÃO	79
8	PERSPECTIVAS	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A – MANUSCRITO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO.....	93
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEUA	109

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas (DC) é uma zoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozoário hemoflagelado pertencente à classe Kinetoplastida (MOREIRA *et al.*, 2004). A principal via de transmissão é a vetorial e ocorre devido a eliminação de formas tripomastigotas metacíclicas do parasita durante o repasto sanguíneo, realizado por insetos hematófagos da subfamília *Triatominae*, os quais são popularmente conhecidos por barbeiros, procotós, chupanças, bicudos ou chupões. A distribuição geográfica da DC, dos reservatórios e vetores do parasita, estende-se do sudeste dos Estados Unidos até sul da América do Sul (KJOS *et al.*, 2008; STEVENS *et al.*, 2012). Apesar de ter sido descoberta há mais de um século, a DC continua sendo uma ameaça à saúde pública. Cerca de 100 milhões de indivíduos estão sob risco de adquirir a infecção pelo *T. cruzi* (OMS, 2010a, 2010b). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a DC é responsável pelo óbito de mais de 10 mil pessoas por ano nos 10 milhões de indivíduos infectados que residem nos 21 países endêmicos da América Latina. Estima-se que a DC subtraia, apenas nas Américas, 426 mil anos (OMS, 2010b) da esperança de vida corrigida pela incapacidade (DALYs) dos acometidos pela doença, evidenciando o motivo desta ser considerada uma das mais importantes doenças negligenciadas parasitárias das Américas.

No Brasil, a DC encontrava-se intimamente relacionada ao nível socioeconômico da população, sendo mais frequente encontrada em indivíduos de áreas rurais com baixa renda financeira, que viviam em condições precárias e com elevado índice de analfabetismo (DIAS e SCHOFIELD, 1999). Em decorrência da transição demográfica das populações rurais para os centros urbanos, foi observada uma mudança no perfil epidemiológico da doença. Este novo cenário está associado à expansão imobiliária com construção de residências em áreas adjacentes aos remanescentes de florestas, aproximando os triatomíneos dos domicílios (DIAS-LIMA e SHERLOCK, 2000). Como consequência do rareamento das fontes naturais de alimento, os triatomíneos são induzidos a buscar novas fontes alimentares, como os animais domésticos e o homem, adaptando-se ao peridomicílio e, subsequentemente ao intradomicílio, contribuindo para o aumento do risco da transmissão do *T. cruzi* (ALMEIDA *et al.*, 2009; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2008; STEINDEL *et al.*, 2008).

Dentre as espécies domésticas de mamíferos reservatórios, os cães são os de maior importância epidemiológica devido à sua proximidade com os seres humanos, elevada suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi*, alta força de infecção de vetores (GÜRTLER e

CARDINAL, 2015), maior parasitemia (ENRIQUEZ *et al.*, 2014), além da capacidade de atrair os vetores (RABINOVICH *et al.*, 2011). Desta maneira, os cães são considerados elementos importantes na manutenção do ciclo de transmissão (ACHA e SZYFRES, 2003; MONTENEGRO *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2008) e apresentam relevância na avaliação epidemiológica da DC. Estes animais podem ser usados como sentinelas, evidenciando a ocorrência do ciclo de transmissão. Ademais, a existência de animais domésticos infectados pode constituir um fator de risco para a infecção humana por agirem concomitantemente como reservatórios biológicos do *T. cruzi* (CURTIS-ROBLES *et al.*, 2017). Existe uma correlação entre a soropositividade em cães e em seres humanos (CRISANTE *et al.*, 2006; GÜRTLER *et al.*, 2007; GÜRTLER *et al.*, 2014; GÜRTLER e CARDINAL *et al.*, 2015). De fato, já foi observado um aumento no risco da infecção pelo *T. cruzi* de até 6 vezes em indivíduos adultos e até 17 vezes em crianças do mesmo domicílio com cães soropositivos para *T. cruzi* (GÜRTLER *et al.*, 1998). Por conta disso, diversos autores evidenciaram a presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em cães domésticos em diferentes regiões endêmicas das Américas, encontrando valores de soroprevalência de 38% na caatinga brasileira (BEZERRA *et al.*, 2014) a 76% na fronteira brasileira com a Bolívia (EDITH *et al.*, 2018) e 67,6% na Venezuela (CRISANTE *et al.*, 2006), o que demonstra a exposição destes animais ao *T. cruzi* (HERRERA *et al.*, 2005; MONCAYO e SILVEIRA *et al.*, 2017). O diagnóstico sorológico limita-se em detectar anticorpos anti-*T. cruzi* e não a parasitemia através da visualização direta do parasita, por isto, é o método de diagnóstico recomendado na fase crônica. A soropositividade é indicativa da circulação atual ou pregressa do *T. cruzi*, ressaltando a sua importância na avaliação do perfil epidemiológico da doença em determinada localidade. Desta forma, com base no exposto e considerando a ausência histórica de sistemas de diagnóstico para a DC em cães, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de testes sorológicos capazes de detectar a infecção causada pelo *T. cruzi* em animais domésticos.

O diagnóstico da DC não é uma tarefa fácil, pois a capacidade diagnóstica do teste depende da fase da doença e das metodologias utilizadas. A maior parte dos seres humanos e animais infectados encontram-se na fase crônica. Nesta fase, as metodologias de diagnóstico baseiam-se em imunoenaios indiretos, que exploram a presença de anticorpos anti-*T. cruzi*, sendo as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) as mais comumente empregadas (DIAS *et al.*, 2016). Dentre estas, o ELISA é a metodologia mais utilizada em virtude de sua facilidade de execução, baixo custo, possibilidade de automação e testagem de vários indivíduos ao mesmo

tempo, permitindo realizar determinações quantitativas de imunoglobulinas específicas, através da análise da atividade enzimática sobre um substrato (YAMAGATA e NAKAGAWA, 2006). No entanto, o desempenho de testes sorológicos variam de acordo com as preparações antigênicas usada (DIAS *et al.*, 2016). De fato, os ensaios que utilizam antígenos nativos do parasita apresentam baixa especificidade, devido aos altos índices de reatividade cruzada com outros tripanosomatídeos filogeneticamente próximo ao *T. cruzi*, como o *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma caninum*, parasitas do gênero *Leishmania* spp., entre outros (VEGA BENEDETTI *et al.*, 2013). Por outro lado, preparações antigênicas constituídas por antígenos recombinantes elevam a especificidade (SANTOS *et al.*, 2016a), pois se utilizam de antígenos distintos, com epítomos de menor homologia entre outros parasitas. Embora o uso de proteínas recombinantes melhore acurácia do teste, ainda há problemas devido ao elevado polimorfismo genético do *T. cruzi* (BRENIÈRE *et al.*, 2016), que apresenta extensas modificações dos antígenos de interesse e afetando negativamente a detecção do anticorpo, o que abaixa a sensibilidade do teste, podendo gerar resultados falso-negativos (SANTOS *et al.*, 2017). Já os antígenos quiméricos são formados por diversas sequências de múltiplos antígenos distintos em uma única molécula, aumentando, desta forma, a possibilidade diagnóstica, ao ofertar uma maior variedade de epítomos. A utilização destes antígenos quiméricos consiste em uma estratégia para elevar os valores de acurácia dos testes, mantendo os índices de reatividade com outros patógenos abaixo daqueles observados para os antígenos nativos e recombinantes não-quiméricos. Recentemente, o nosso grupo sintetizou quatro antígenos quiméricos e avaliou o seu potencial no diagnóstico da DC crônica em seres humanos (SANTOS *et al.*, 2016a). Após a realização dos estudos de fase I e II empregando os testes de ELISA, o microarranjo líquido e a imunocromatografia, os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 apresentaram desempenho superior ao dos testes comerciais disponíveis no Brasil (SANTOS *et al.*, 2016b; 2017, 2018). Com base nos resultados obtidos em seres humanos e na necessidade do desenvolvimento de testes sorológicos para a detecção da DC em cães, as moléculas IBMP-8.1, -8.2, -8.3 e -8.4 foram selecionadas para a avaliação no presente estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas foi descrita pela primeira vez em 1909, pelo cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934) em Lassance, Minas Gerais. Naquela ocasião, Carlos Chagas foi designado para combater uma epidemia de malária que acometia os trabalhadores da antiga Ferrovia Central do Brasil. Após transformar um vagão de trem em seu laboratório, Chagas foi avisado da existência de insetos hematófagos habitando as residências, conhecidos pelos locais como barbeiros, procotós, chupanças, bicudos ou chupões. Os barbeiros atacavam o homem à noite e se escondiam em frestas das paredes e coberturas das casas durante o dia, sendo encontrados com mais frequência em habitações precárias, choupanas de paredes sem reboco e cobertas por palha. Estas observações aguçaram a curiosidade científica do pesquisador levando-o a encontrar protozoários flagelados no intestino médio destes insetos. A esta nova espécie deu-se o nome de *Schizotrypanum cruzi*, atualmente denominado *Trypanosoma cruzi*, em homenagem ao seu mentor, o pesquisador Oswaldo Cruz (1872-1917) (CHAGAS, 1909). Alguns exemplares infectados foram enviados ao Instituto Oswaldo Cruz para que fossem alimentados em saguis da espécie *Callithrix penicilata*, sendo os protozoários posteriormente isolados do sangue periférico destes animais. Além disso, a infecciosidade do protozoário foi confirmada em vários hospedeiros (coelhos, cães, macacos e camundongos), os quais apresentaram formas parasitárias circulantes semelhantes àquelas encontradas no trato digestivo dos insetos (CHAGAS, 1909). Chagas suspeitou que estivesse se deparado com um agente patogênico causador de infecção humana, mas não sabia qual doença era capaz de causar. A descoberta aconteceu ao analisar o sangue de uma criança de dois anos de idade chamada Berenice, que estava na fase aguda da doença. Ela habitava uma residência infestada de barbeiros e apresentava sintomas inespecíficos como febre, linfonomegalia e hepatoesplenomegalia (KROPF e SÁ, 2009). Foi observada uma grande quantidade de formas flageladas do *T. cruzi* semelhantes àquelas detectadas previamente no sangue dos mamíferos experimentalmente infectados. Esta doença foi então denominada como *Tripanossomíase americana* pelo Dr. Chagas, porém, ficou notoriamente conhecida como a “Doença de Chagas”, termo inicialmente usado por médicos incrédulos desta descoberta, para ridicularizar o seu descobridor.

O Dr. Carlos Chagas teve a oportunidade de ser o primeiro pesquisador a descrever um caso clínico da doença, tanto em humanos quanto em cães. Nos anos seguintes, Chagas identificou outros hospedeiros e ainda descreveu os aspectos anatomopatológicos e epidemiológicos da doença, além de documentar a presença do parasita em diversas espécies de vetores, além de reservatórios silvestres, deixando assim uma grande contribuição à ciência (GOLDBAUM e BARRETO, 2008).

2.2 BIOLOGIA DO *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado pertencente à família *Trypanosomatidae*, do reino Protozoa, da ordem Kinetoplastida. Sua membrana plasmática é composta por uma camada bilipídica, sendo as proteínas um de seus principais componentes. Uma característica peculiar do *T. cruzi* está em sua elevadíssima diversidade genética e fenotípica, podendo variar em até 48% no tamanho de seu genoma, um atributo notável para populações da mesma espécie. Ademais, o parasita apresenta elevada variação na expressão de antígenos de acordo com as cepas (FIGURA 1), o que é um dos fatores responsáveis pela baixa concordância entre testes diagnósticos comerciais empregados em diferentes regiões.

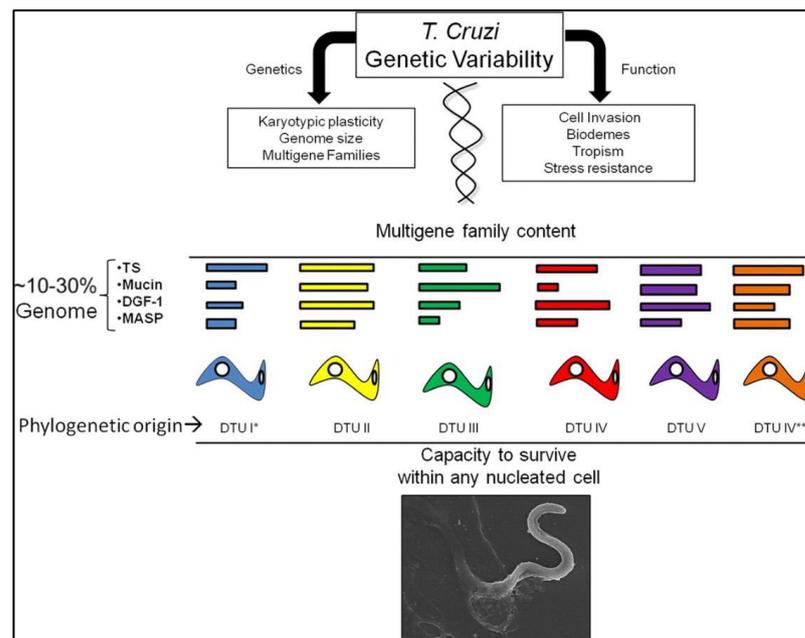


Figura 1 – Representação esquemática da variação na expressão de famílias de antígenos de acordo com diferentes DTUs.

Fonte: De Pablos *et al.* (2012).

Legenda: TS (*trans-sialidases*), DGF-1 (*Dispersed Gene Family-1*), MASP (*mucin-associated surface proteins*), *(Silvio X10/1 - DTU I), **(CL-Brener - DTU VI).

O genoma nuclear deste organismo é organizado em pares de cromossomos, com tamanhos e quantidades variáveis, contribuindo para sua plasticidade genômica e diversidade fenotípica (ZINGALES, 2018). O parasita possui um ou dois flagelos oriundos de uma abertura conhecida como bolsa flagelar, a qual dispõe de estruturas paraflagelares próximas, além do cinetoplasto, uma organela contendo DNA condensado. O cinetoplasto é uma organela peculiar da ordem Kinetoplastida e encontra-se intimamente relacionada à mitocôndria do parasita, sendo considerada como parte dela por muitos autores. Diferente das outras ordens eucariotas, nas quais cerca de 1% do seu genoma encontra-se nas mitocôndrias, a ordem dos Kinetoplastida armazena de 16 a 30% de seu genoma no cinetoplasto. O DNA do cinetoplasto (kDNA) possui seus genes organizados em estruturas circulares e é composto, em média, por 5.000 a 20.000 microcírculos e 50 cópias de maxicírculos por rede de cinetoplasto (MOREIRA *et al.*, 2004). O flagelo do parasita é composto por nove pares de microtúbulos, dispostos em círculo, imersos em matriz citoplasmática e envolvidos em toda a sua extensão por uma membrana celular.

Para adaptar-se aos diferentes ambientes, o *T. cruzi* passa por alterações estruturais e metabólicas. O parasita apresenta de três formas evolutivas distintas: amastigota, tripomastigota e epimastigota. A amastigota (Figura 2A) é a forma intracelular do parasita, sendo encontrada nas células teciduais dos hospedeiros vertebrados. Nesta forma, o parasita mede de 2 a 6,5 μm , tem capacidade de evasão do sistema imunológico (SOARES-SILVA *et al.*, 2016), não possui flagelo proeminente e seu movimento é limitado à rotação. As formas amastigotas multiplicam-se por cissiparidade (fissão/divisão binária) longitudinal a cada 12 horas e transformam-se em tripomastigotas entre 11 e 13 horas após a ruptura celular, causada pela crescente população de parasitas intracelulares.

A forma epimastigota (Figura 2B) é encontrada no trato digestivo dos vetores, em glândulas anais de alguns marsupiais (JANSEN *et al.*, 2017) e em cultivos axênicos. Esta forma apresenta o flagelo livre, bolsa flagelar anterior ao núcleo e mede de 20 a 40 μm (considerando o flagelo). A forma epimastigota é altamente móvel, multiplica-se rapidamente por divisão binária e é conhecida por formar rosetas em cultivos axênicos, que são estruturas em forma de flor compostas por diversos parasitas aglomerados em distribuição radial. Nesta forma evolutiva, o parasita não tolera temperaturas acima de 37° C, por isto, os cultivos axênicos mantêm a temperatura entre 20 e 28° C.

A forma tripomastigota é a forma infecciosa do parasita, não possui capacidade mitótica e pode ser encontrada como tripomastigota sanguíneo ou metacíclico em hospedeiros vertebrados ou invertebrados (Figura 2C). A forma tripomastigota metacíclica é encontrada no tubo digestivo dos triatomíneos ou nos túbulos de Malpighi (porção excretora do sistema digestivo dos vetores). Nesta forma, o protozoário mede de 12 a 20 μm , possui um núcleo grande e centralizado, além de um cinetoplasto com kDNA altamente condensado.

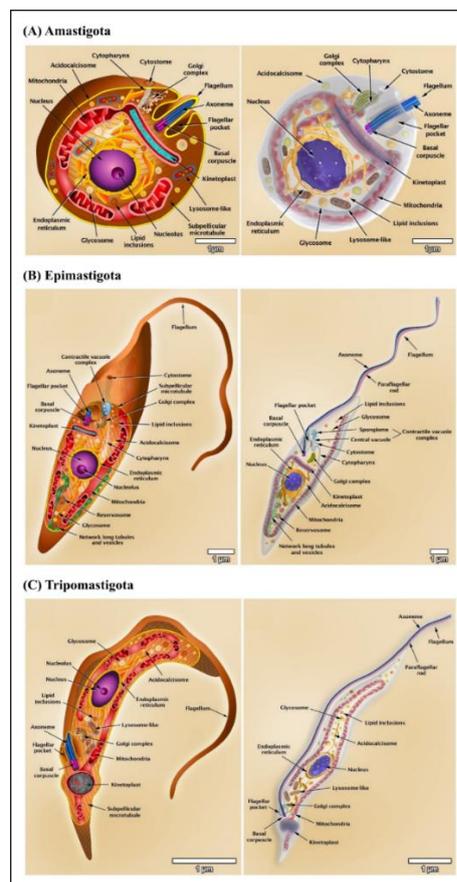


Figura 2 - Desenho esquemático das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* e suas organelas.

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

Nota: (A) Amastigota; (B) Epimastigota; (C) Tripomastigota.

2.3 VIAS DE TRANSMISSÃO

As principais vias de transmissão da doença de Chagas em humanos são a vetorial, transfusional, congênita, oral, por transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e, recentemente, foi sugerida a possibilidade deste agente ser transmitido sexualmente (ARAÚJO *et al.*, 2017). Em cães, a via vetorial é a predominante, a qual é causada por insetos triatomíneos. Durante a transmissão vetorial (Figura 3), o barbeiro recebe uma grande quantidade de massa

alimentar advinda do repasto sanguíneo levando a excreção de fezes e urina, geralmente na superfície da pele próxima ao local do repasto. Este excremento contém formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, capazes de penetrar ativamente na mucosa e na pele através de movimentos ativos e secreção de enzimas histolíticas (DUSCHAK e COUTO, 2009). A picada do triatomíneo pode desencadear um intenso prurido, facilitando a penetração do parasita, além de possibilidade de infecção através de superfícies mucosas ao levar passivamente as formas metacíclicas aos olhos ou à boca. Além desta via, especula-se que os cães sejam infectados através da via oral, devido ao consumo de animais ou vetores parasitados (MONTENEGRO *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2009; SILVA-DOS-SANTOS *et al.*, 2017).

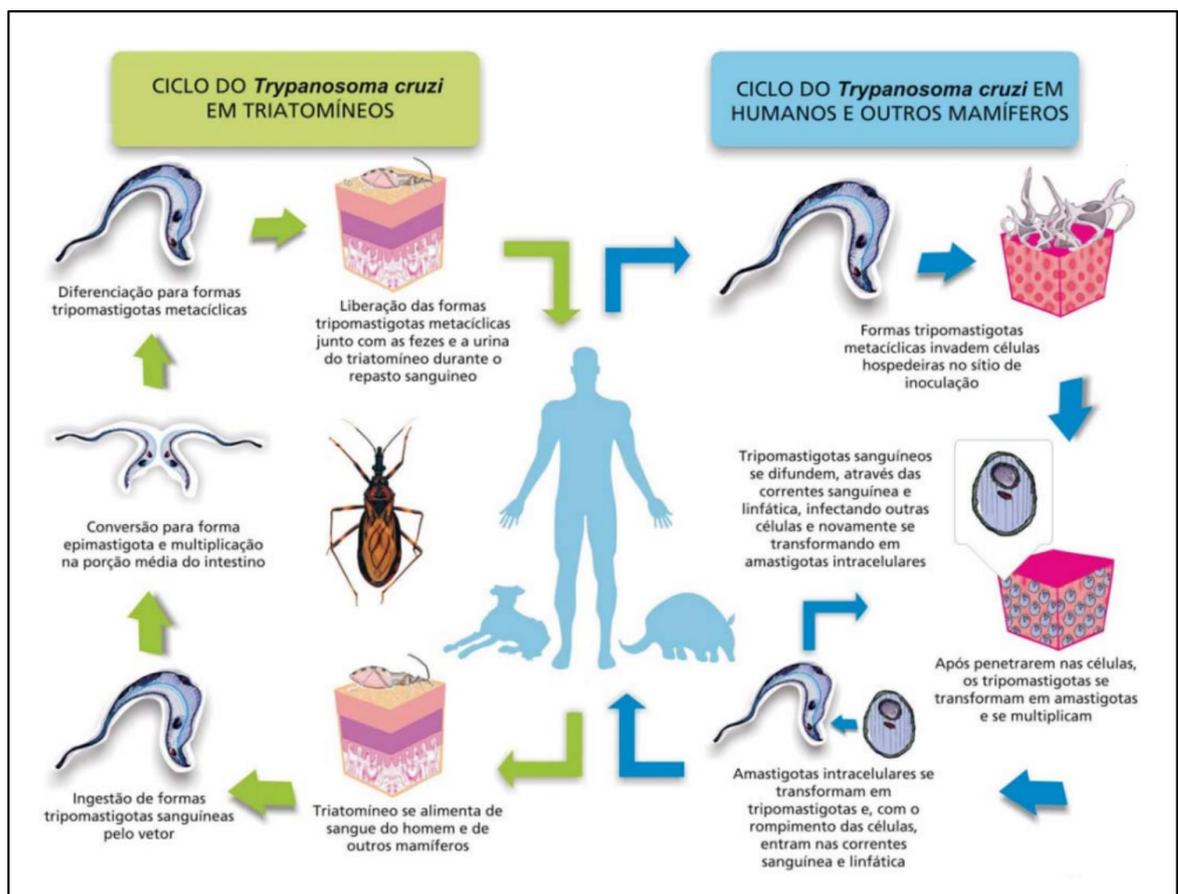


Figura 3 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e em triatomíneos. Fonte: Argolo *et al.* (2008).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

De acordo com as características clínicas e laboratoriais, a DC pode ser classificada em duas fases distintas: uma aguda, seguida pela fase crônica. A fase aguda ocorre nos primeiros

dias após a exposição até os próximos dois ou três meses. Nesta fase, o indivíduo infectado apresenta uma parasitemia elevada, baixa titulação de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* e pode apresentar manifestações clínicas inespecíficas. A fase crônica, por sua vez, pode ser classificada em crônica indeterminada ou sintomática. Esta se instala após a fase aguda e se estende por toda vida, sendo caracterizada pela presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* e parasitemia subpatente. A maior parte dos indivíduos na fase crônica encontram-se no estado indeterminado, que pode ser “definido pela presença de infecção pelo *T. cruzi* na ausência de manifestações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas de acometimento cardíaco ou digestivo” (RIBEIRO e ROCHA, 1998). A evolução clínica da DC assemelha-se entre humanos e cães, sendo que os cães já foram propostos como um modelo experimental para a DC (ANDRADE, 1984). De fato, os cães exibem muitos dos sinais e manifestações clínicas da DC humana, embora existam relatos de que a doença em cães seja mais agressiva, marcada por parasitemia superior àquela observada em humanos (ENRIQUEZ *et al.*, 2014) e com maior acometimento neurológico e cardíaco, embora sejam raros os casos de evolução para forma digestiva em cães.

2.4.1 A doença de Chagas aguda

Nesta fase, muitas células nucleadas podem ser alvo do *T. cruzi*. Em seres humanos, os sinais e sintomas iniciam, em geral, entre 4 e 10 dias pós-infecção, sendo muitas vezes semelhantes aos de uma virose. Desta forma, os indivíduos infectados podem apresentar febre, diarreia, mal-estar, fraqueza, anorexia, linfonomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, inflamação no local da picada (também conhecido como “chagoma de inoculação”, em casos de transmissão vetorial), edema da pálpebra (conhecido como “Sinal de Romana”), além de distúrbios cardíacos (ARGOLO *et al.*, 2008).

Achados clínicos em cães foram relatados em animais experimentalmente infectados, como elevação da temperatura retal, chegando à 40° C, paraplegia, diarreia, linfonomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia e respiração irregular. Cães infectados pela via conjuntiva ocular apresentaram edema uni ou bilateral das pálpebras, acompanhado de lacrimejamento, análogo ao sinal de Romana observado em humanos. Neste mesmo estudo, 17% dos 64 cães evoluíram para morte súbita (DIAS *et al.*, 2016). Em um segundo estudo, cães jovens foram experimentalmente infectados por múltiplas vias, incluindo a via conjuntiva, sendo observada uma mortalidade variável de acordo com a cepa, oscilando entre 53% nos animais infectados com a cepa Be-78 à 26.3% em animais infectados com a cepa Be-62 (DE LANA *et al.*, 1992).

Tais índices são superiores à mortalidade observada na DC aguda humana, a qual é de aproximadamente 2.8% (MARTINS-MELO *et al.*, 2012).

Nesta fase, cães experimentalmente infectados desenvolvem anomalias cardíacas análogas às observadas em humanos, como bradicardia e miocardite (Figura 4C), além de distúrbios eletrocardiográficos, como bloqueio atrioventricular de primeiro grau, inversão da onda T e alterações inespecíficas do segmento ST (ANDRADE *et al.*, 1994). A maioria dos animais desenvolve uma miocardite análoga àquela encontrada em humanos (ANDRADE, 1999; ANDRADE, FERRANST *et al.*, 1994; GUEDES *et al.*, 2009). De fato, análises histopatológicas em cães revelaram a presença de células inflamatórias, predominantemente macrófagos e linfócitos, localizadas próximas aos cardiomiócitos lesionados ou fragmentos de células, um cenário comum na miocardite chagásica humana (ANDRADE, 1999). Avaliações estruturais revelaram a presença de até 90 amastigotas no citoplasma dos miócitos (Figura 4A) destes cães. Células apoptóticas e necróticas, semelhantes às encontradas em humanos, foram observadas nos cortes histológicos do tecido cardíaco destes animais (Figura 4B) (ZHANG *et al.*, 1999).

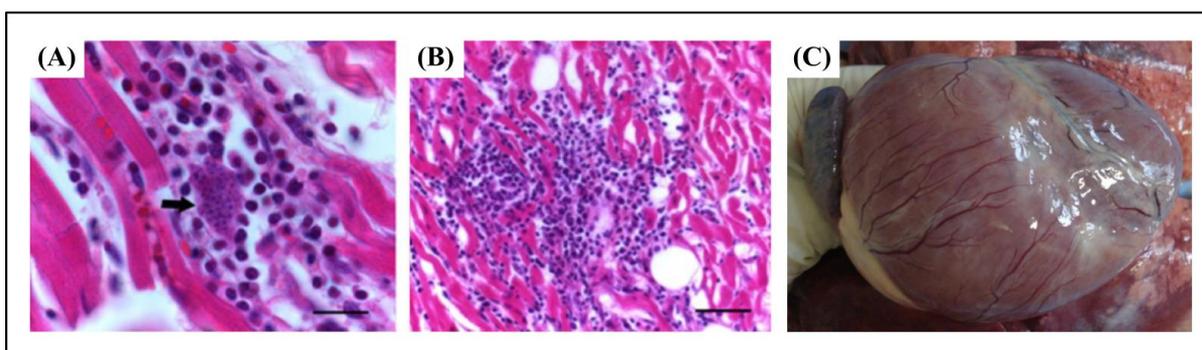


Figura 4 - Achados clínicos e laboratoriais da doença de Chagas aguda em cães.

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

Nota: (A) Análise histológica revelando a presença de amastigotas próximas as células mononucleares no interstício do miocárdio (seta), coradas com hematoxilina-eosina, com aumento de 100x; (B) Infiltrados celulares em múltiplas zonas graves no interstício do miocárdio, aumento de 40x, coloração hematoxilina-eosina; (C) Cardiomegalia chagásica em coração canino. O coração encontrava-se com aspecto notavelmente globóide e com focos brancos na superfície do epicárdio do ventrículo direito.

2.4.2 A doença de Chagas crônica

Por conta do desenvolvimento de uma resposta imune específica, marcada pela produção de anticorpos específicos IgG anti-*T. cruzi* e uma resposta celular específica, a parasitemia e o parasitismo tissular sofre uma diminuição substancial, caracterizando assim o fim da fase aguda

da DC. No entanto, o parasita pode não ser eliminado completamente do organismo, ele ainda pode persistir em sua forma intracelular (amastigota), escondido nos tecidos biológicos sólidos, especialmente no músculo cardíaco, fígado, baço, nos gânglios entéricos e no tecido adiposo (NAGAJYOTHI *et al.*, 2009; RASSI e MARIN-NETO, 2010). Inicia-se, desta forma, uma fase crônica que pode ser sintomática ou indeterminada (assintomática), as quais são caracterizadas por uma parasitemia baixa, ausente ou abaixo do nível de detecção, acompanhada por uma elevada presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. A fase crônica sintomática pode apresentar-se nas formas cardíacas e/ou digestivas da doença. Em humanos, afeta cerca de 30% dos indivíduos infectados (OMS, 2010b). Em cães, não há estimativas do percentual de animais que evoluem para a forma sintomática. A fase crônica sintomática é caracterizada por alterações patológicas nos tecidos afetados, como aquelas observadas no sistema de condutividade do músculo cardíaco, modificações estruturais do miocárdio e/ou, mais raramente, do esôfago e colón. (YAMAGATA; NAKAGAWA, 2006)

Os cães desenvolvem alterações patológicas similares às descritas em seres humanos. De fato, os animais podem desenvolver cardiomegalia (Figura 4C), congestão cardíaca e/ou hepática, fibrose cardíaca, hipertrofia ventricular, (COURA, 2003), linfonodomegalia generalizada e hepatoesplenomegalia (ANDRADE, 1999). Embora não existam estudos veterinários de morbimortalidade da DC em cães, há relatos de mortes súbitas (ALMEIDA *et al.*, 2013; BARBOSA-PLIEGO *et al.*, 2009; SARKAR *et al.*, 2010), nas quais, em análises histológicas *post-mortem*, revelou-se tratar de casos fatais de tripanossomíase americana (DC) canina, sendo que a miocardite granulomatosa necrotizante associada às formas amastigotas do *T. cruzi* foi o achado microscópico predominante nestes casos (WILLIAMS *et al.*, 1977).

2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da doença de Chagas não é simples e seu êxito depende de múltiplos fatores, como o tempo de infecção, o nível da parasitemia, o método diagnóstico, a possibilidade de reações cruzadas e a parasitemia.

O diagnóstico na fase aguda visa observar diretamente o parasita através da técnica de gota espessa ou indiretamente através do xenodiagnóstico ou hemocultivo. Nesta fase, o parasita é encontrado na sua forma tripomastigota circulando na corrente sanguínea e o seu achado é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da DC. Os métodos sorológicos não são adequados para diagnosticar a doença na fase aguda, considerando que nesta fase, os exames

diretos possuem um melhor desempenho. Este fato se deve à ausência ou baixos títulos de anticorpos IgG específicos e à inexistência de testes comerciais para detecção de IgM anti-*T. cruzi*.

O diagnóstico por meio do xenodiagnóstico baseia-se na infecção experimental de um vetor após repasto sanguíneo em indivíduos com suspeita de infecção. Este é o método que apresenta a maior sensibilidade na fase aguda. No entanto, o xenodiagnóstico, está caindo em desuso no Brasil, em virtude de ser uma metodologia laboriosa, necessitar de instalações especiais para a manutenção do vetor, apresentar baixa sensibilidade na fase crônica e por ser inconveniente para o usuário (ORTIZ *et al.*, 2015).

O hemocultivo compartilha muitas limitações descritas no xenodiagnóstico, considerando que ambas as metodologias visam expandir a população parasitária em um segundo recipiente (ORTIZ *et al.*, 2015). No hemocultivo, não há a necessidade de se criar animais ou triatomíneos, porém, é um método laborioso, não é automatizado e a análise final pode demorar até 3 meses para uma conclusão diagnóstica (XAVIER *et al.*, 2012).

Na fase crônica, os métodos sorológicos indiretos são os mais apropriados para o diagnóstico da DC, devido à parasitemia subpatente ou ausente e presença de anticorpos específicos, principalmente IgG anti-*T. cruzi*. Dentre os ensaios sorológicos empregados estão a imunofluorescência indireta (IFI), a hemaglutinação indireta (HAI), os testes imunocromatográficos e a técnica de imunoadsorção enzimática (ELISA), sendo esta última a mais utilizada devido à sua baixa complexidade, capacidade de automação e alta eficiência diagnóstica, porém, esta plataforma apresenta um desempenho variável de acordo com o antígeno empregado (ROSÁRIO *et al.*, 2005; SANTOS, 2016a, 2016b). O método de ELISA (Figura 5) utiliza um antígeno adsorvido à fase sólida de microplacas de poliestireno. Os poços das microplacas, uma vez sensibilizados com os antígenos, são expostos ao material analisado e incubados para que ocorra a interação antígeno-anticorpo. Caso ocorra a ligação do anticorpo ao antígeno, um segundo anticorpo, anti-IgG conjugado à uma enzima peroxidase de rabanete (HRP) é adicionado ao poço. Em seguida, uma mistura de substrato enzimático com um agente cromógeno é acrescentada. Caso o conjugado esteja presente, haverá mudança de cor em um nível diretamente proporcional à quantidade de anticorpos presentes, considerando que este é um método não-competitivo.

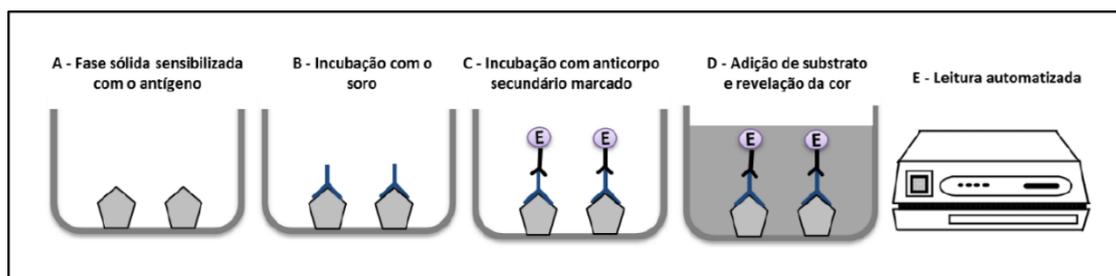


Figura 5 - Desenho esquemático do procedimento de ELISA indireto.
Fonte: Santos (2016a).

O princípio da IFI baseia-se na interação de anticorpos anti-*T. cruzi* presentes em uma amostra frente à epimastigotas fixadas em lâminas de vidro para microscopia. A ligação antígeno-anticorpo é revelada através da interação com um anticorpo secundário conjugado à um fluoróforo. A IFI, por utilizar o parasita inteiro, tende a ter alta sensibilidade, mas baixa especificidade. Apesar de ainda ser empregada, esta metodologia está caindo em desuso devido a laboriosidade da técnica, que necessita do parasita inteiro para confecção das lâminas, a ocorrência de reações cruzadas, subjetividade da interpretação dos resultados e por sua incapacidade de automação, assim como a HAI. A HAI apresenta limitações similares, além de depender da interpretação visual do operador e necessitar de diluições seriadas, o que afeta negativamente seu rendimento em rotina.

O consenso brasileiro sobre a DC (DIAS *et al.*, 2016) recomenda o emprego de dois testes sorológicos distintos, sendo um com maior sensibilidade e outro de maior especificidade, para a o diagnóstico laboratorial da doença crônica em humanos. Além dos testes sorológicos, há também as técnicas moleculares, como a PCR, que investigam a presença do material genético do parasita, logo, sua sensibilidade é diretamente proporcional a parasitemia, porém, como a fase crônica é caracterizada pela baixa parasitemia, esta técnica tende a ter baixa sensibilidade, apesar da alta especificidade. Embora a utilização de *primers* que se anelem à sequências de kDNA aumente a sensibilidade da PCR, a utilização de técnicas moleculares para diagnóstico na fase crônica da doença são desaconselhados (BRASIL *et al.*, 2010). Por conta da parasitemia subpatente, o desempenho diagnóstico da PCR na fase crônica apresenta baixa sensibilidade, por isto, metodologias diretas, mesmo moleculares, são desaconselhadas para diagnosticar a DC crônica (BRASIL *et al.*, 2010).

2.6 EPIDEMIOLOGIA

O *T. cruzi* é prevalente na maior parte do continente americano e pode ser encontrado desde o Sul dos Estados Unidos até o sul da América Latina. Apesar do parasita encontrar-se bem estabelecido no continente americano, ele não está restrito a esta localidade. De fato, em virtude do aumento do fluxo migratório de indivíduos infectados provenientes de áreas endêmicas, a DC encontra-se em expansão para novos continentes e regiões não-endêmicas, em especial para países da Europa, América do Norte, Oceania e Ásia (Figura 6) (OMS, 2010a, 2010b). Além disso, mudanças climáticas associadas a presença de hospedeiros infectados podem ocasionar a dispersão de triatomíneos para outros territórios, contribuindo para propagação da doença (KLOTZ *et al.*, 2014).

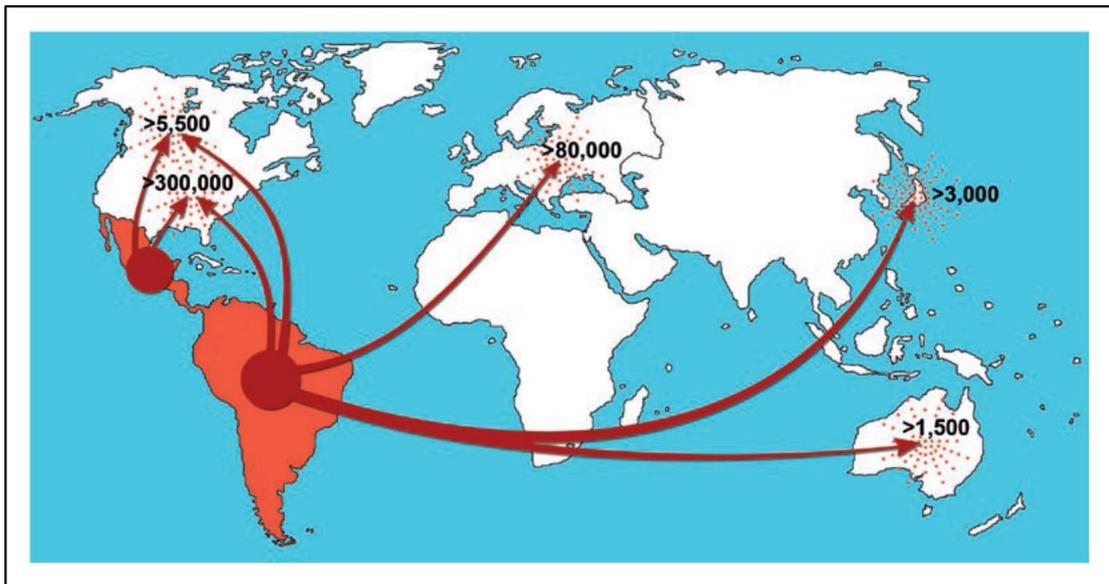


Figura 6 - Rotas migratórias de indivíduos portadores da doença de Chagas de áreas endêmicas para países não endêmicos.

Fonte: Viñas *et al* (2010).

Até o momento, mais de 150 espécies de barbeiros já foram descritas como potenciais agentes vetores para a transmissão do *T. cruzi*. Destas, 52 são encontradas no Brasil, sendo apenas 5 com hábitos domésticos (SCHOFIELD, 2000). O *Triatoma infestans* é a única espécie de ciclo exclusivamente doméstico, exceto na Bolívia, onde demonstra hábitos peridomiciliares e silváticos, habitando fissuras nas pedras e realizando o repasto sanguíneo em roedores do gênero *Cavia* spp. (porquinhos da índia) (CORTEZ *et al.*, 2010).

Embora seja evidente o decréscimo da prevalência e incidência da DC humana na América Latina, especialmente depois de 1991, com a Iniciativa do Cone Sul, um programa de controle vetorial intergovernamental, envolvendo os governos da Argentina, Brasil, Paraguai, Uruguai,

Chile e Bolívia, a DC continua representando um risco global. De fato, espécies de triatomíneos foram encontradas desde o Sul da América do Norte até regiões costeiras do continente africano, Oriente Médio, Ásia e regiões ocidentais do Pacífico, tendo se espalhado através do comércio marítimo da América Latina desde o início do século XVI (SCHMUNIS e YADON, 2010).

Além da transmissão vetorial, a transmissão oral obteve notoriedade nos últimos anos devido ao seu papel nos surtos da doença de Chagas humana. Estes surtos ocorrem por conta do consumo de alimentos contaminados com as fezes de vetores infectados, que por sua vez, são ricas nas formas tripomastigotas metacíclicas do parasita. De fato, no Brasil, há diversos relatos do surtos da doença, onde a infecção se deu através da via oral, pelo consumo de açaí (*Euterpe oleracea*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (NÓBREGA *et al.*, 2009). Surtos decorrentes da infecção oral também foram observados na Venezuela, onde a infecção oral se deu provavelmente através do suco contaminado de goiaba (*Psidium guajava*) (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2010). Ademais, a infecção oral tende a ser mais grave do que a infecção vetorial, apresentando sintomas mais profundos e um aumento da mortalidade em humanos, quando comparados à infecção vetorial (SILVA-DOS-SANTOS *et al.*, 2017). Estudos com cães experimentalmente infectados, o inóculo quando realizados através da via conjuntiva é em torno de 2.000 parasitas por quilograma (LANA *et al.*, 1992), porém, por via intra-peritoneal, o inóculo é de 25.000 parasitas por quilograma (ANDRADE, 1984).

A força de infecção (infecciosidade) dos cães, isto é, a capacidade do hospedeiro em infectar vetores, é diretamente proporcional à parasitemia, por isto, cães demonstram ter uma infecciosidade superior aos dos seres humanos. Ademais, a força de infecção entre um triatomíneo e um cão pode ser até 50 vezes superior àquela observada em humanos após um único repasto sanguíneo (GÜRTLER e CARDINAL, 2015). A infecciosidade é significativamente aumentada em cães malnutridos, provavelmente em decorrência do comprometimento do sistema imunológico (JIMENEZ-COELLO *et al.*, 2010a), acentuando o papel epidemiológico de animais abandonados ou cães de rua.

O *T. cruzi* apresenta ampla variação genética, apresentando mais de 6 mil cepas circulantes do parasita organizadas em sete categorias denominadas de DTUs (*Discrete typing units*), TcI até TcVI, além do TcBat, um DTU recentemente proposto e de ciclo predominante em morcegos (ZINGALES, 2018). A TcI é a DTU mais amplamente distribuída, como ilustrado na figura 7, sendo encontrada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e é mais frequente em reservatórios biológicos e vetores, enquanto o TcII apresenta uma maior

incidência em humanos (BRENIÈRE *et al.*, 2016). Dentre as DTUs, a TcI é a mais comum tanto no ciclo silvático quanto no doméstico e exibe uma elevada variação genética (BRENIÈRE *et al.*, 2016).

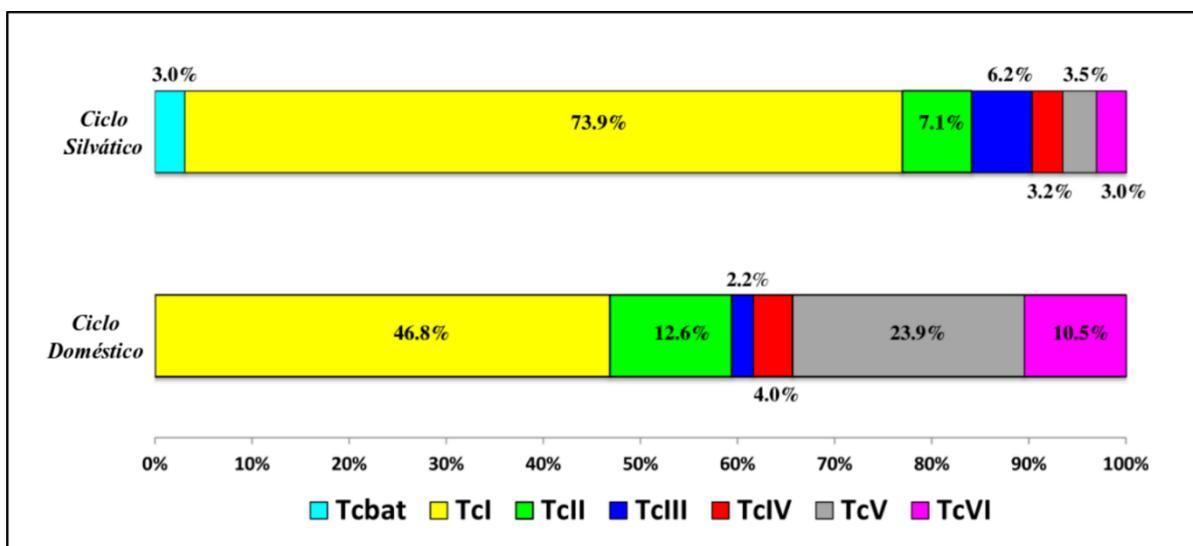


Figura 7 - Distribuição mundial das DTUs do *Trypanosoma cruzi* circulantes em animais (domésticos e silvestres) e humanos.

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

As DTUs TcII, V e VI estão mais associadas a ciclos domésticos e infecções humanas nos países do Cone Sul. As DTUs TcIII e IV são encontradas especialmente nos ciclos silváticos das florestas tropicais. Já está bem estabelecido que uma infecção com mais de uma DTU podem coexistir no mesmo vetor ou em um único hospedeiro (MONJE-RUMI *et al.*, 2015). O TcBat, previamente identificado em morcegos, foi recentemente isolado em humanos. Nesta ocorrência, tratou-se de uma criança colombiana de 5 anos com uma co-infecção com isolados das DTUs TcBat e TcI (RAMÍREZ *et al.*, 2014). A TcV e TcVI são mais comumente associadas ao ciclo doméstico, embora o TcVI ocorra mais em cães do que em seres humanos. A figura 8 ilustra a relação das DTUs do *T. cruzi* nos ciclos doméstico, peridoméstico e silvático envolvendo hospedeiros, reservatórios, sentinelas e vetores no Brasil (GÜRTLER *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2013a; 2013b;).

Desta forma, fica evidente a importância dos cães no ciclo da DC e, conseqüentemente, a necessidade do desenvolvimento de métodos diagnósticos capazes de identificar corretamente animais infectados em áreas endêmicas, auxiliando no sucesso dos programas de controle vetorial.

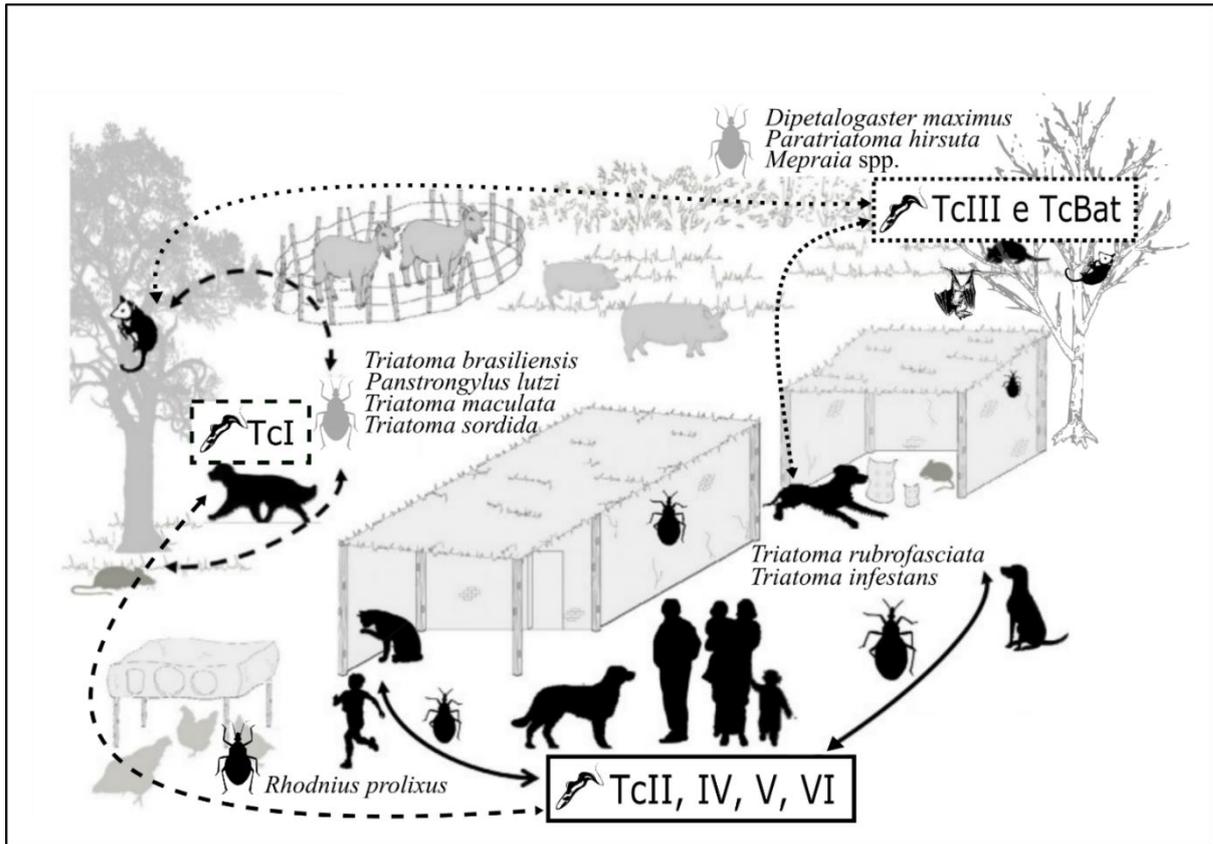


Figura 8 - Ilustração da intercalação dos ciclos e DTUs entre os ciclos doméstico, silvático e peridoméstico de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil.

Fonte: Modificado de Gürtler *et al* (2015).

Nota: As rotas pontilhadas representam o ciclo silvestre, as rotas tracejadas representam o ciclo peridoméstico e as rotas de linhas contínuas representam o ciclo doméstico da DC.

2.7 A DOENÇA DE CHAGAS E OS CÃES

Cães infectados com o *T. cruzi* apresentam muitos sinais clínicos similares aos relatados em humanos, tanto na fase aguda quanto na crônica, de forma que estes animais são usados como modelo experimental para DC (ANDRADE, 1984; GUEDES *et al.*, 2009; LANA; CHIARI; TAFURI, 1992). De fato, cães experimentalmente infectados apresentaram alterações nos níveis de marcadores inflamatórios, como o aumento de IFN- γ e TNF- α e diminuição de IL-10, alterações similares ao da cardiomiopatia chagásica observada em humanos. Por conta desta similaridade clínica, os cães também já foram utilizados como modelo para o desenvolvimento de quimioterápicos para DC (GUEDES *et al.*, 2009). Há relatos que cães desenvolvam uma maior parasitemia que a observada em humanos (ENRIQUEZ *et al.*, 2014), favorecendo a sua infecciosidade para insetos vetores, revelando uma das razões do animal ser considerado o reservatório doméstico mais importante do *T. cruzi*.

O papel dos cães como animais sentinela é bem estabelecido por diversos autores, porém, sua função como reservatórios, segundo Jansen (2008), não ocorre em todos os ambientes. De acordo com Jansen (2008), em quatro ambientes analisados (Navegantes-SC, Redenção-CE, Cachoeiro do Arari-PA e Panacauera-PA) os cães atuavam como barreira biológica, visto que estão expostos ao ciclo de transmissão, mas sem participação ativa na amplificação do parasito, uma vez que não apresentaram hemocultivos positivos, indicando uma parasitemia subpatente. Paradoxalmente, em um estudo realizado no Texas, 91% dos cães sorologicamente reativos para DC apresentaram parasitemia ativa, evidenciada pela detecção de kDNA em PCR (ENRIQUEZ *et al.*, 2013). Em um outro estudo, na Argentina, os investigadores observaram parasitemia em 86% dos animais sorologicamente reagentes, o que corrobora, segundo os autores, para a hipótese do cão exercer o papel de reservatório (ENRIQUEZ *et al.*, 2014). Os índices discrepantes de parasitemia canina entre os estudos supracitados podem ser devidos aos métodos de diagnóstico empregados ou às diferentes cepas circulantes. Considerando que cada cepa diverge em termos de virulência (ZINGALES, 2018), é possível que as circulantes naquela região sejam menos adaptadas à infecção canina, o que explica as observações realizadas por Jansen *et al.* (2008). Contudo, outros estudos conduzidos no Brasil encontraram altos índices de parasitemia entre os cães, chegando a 60% de positividade nos hemocultivos dos animais sorologicamente reagentes para *T. cruzi* no município de Botucatu, São Paulo (LUCHEIS *et al.*, 2005). Em um outro estudo, no México, os autores observaram uma soroprevalência canina em 42/345 (12.1%) e parasitemia em 10/42 (23.8%) dos animais sorologicamente reagentes para *T. cruzi*. Apesar do papel do cão como reservatório ser controverso para alguns autores, animais sorologicamente positivos são reportados em diversos outros estudos como reservatórios e/ou sentinelas e, por isso, a soropositividade dos cães domésticos tem sido referida como fator de risco em modelos matemáticos de vulnerabilidade epidemiológica para DC em humanos (COFFIELD *et al.*, 2013).

A prevalência do *T. cruzi* em animais domésticos provenientes de áreas endêmicas, especialmente cães, tende a ser superior àquela observada em humanos (CASTILLO-NEYRA *et al.*, 2015; GONZALEZ *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2012). Adicionalmente, a proporção de triatomíneos parasitados pode aumentar em até 4.5 vezes em residências onde há cães sorologicamente positivos para *T. cruzi*, elevando assim o risco de infecção humana em adultos e crianças. (GÜRTLER *et al.*, 2005). Ademais, o ciclo de infecção em cães está associado ao ciclo doméstico e peridoméstico, uma vez que o cão parasitado pode reintroduzir o parasita em vetores domésticos (Figura 8) e pode atrair vetores para ambientes domésticos. De fato, há

relatos nos quais os cães foram apontados como a principal fonte alimentar para os triatomíneos em áreas domésticas e peridomésticas, seguidos por humanos e aves (FERNANDES *et al.*, 1992). Esta situação pode ser explicada devido aos hábitos dos cães domésticos passarem a maior parte do tempo circulando fora da casa, alimentarem-se de barbeiros e terem parasitemia superior à dos seres humanos (GÜRTLER *et al.*, 1991; ENRIQUEZ *et al.*, 2014; GÜRTLER e CARDINAL, 2015).

Estes animais podem exercer a função de sentinelas do *T. cruzi*, evidenciando a presença do parasita, do seu ciclo de transmissão e apresentando correlação com a positividade em humanos (GÜRTLER *et al.*, 2007; 2014; GÜRTLER e CARDINAL, 2015). As taxas de infecção natural pelo *T. cruzi* em cães variam de acordo com a situação epidemiológica de cada localidade e geralmente são elevadas quando há altos índices de triatomíneos infectados (LUCHEIS *et al.*, 2005; ELOY *et al.*, 2009). No norte do Chile a prevalência chega à 10,3% (GONZALEZ *et al.*, 2015), enquanto que no México (PORTUGAL-GARCÍA *et al.*, 2011) e no nordeste da Argentina (ENRIQUEZ *et al.*, 2013) a prevalência foi de 24,2% e 50,1%, respectivamente (QUADRO 1). Nas imediações do Parque Nacional da Serra da Canastra, no estado de Minas Gerais, Brasil, foi encontrada a prevalência em cães de 29,4% (ROCHA *et al.*, 2013b). Números elevados de positividade também foram descritos em animais em Abaetetuba-PA (57,1%) (ROQUE *et al.*, 2013), em Tauá-CE (38%) (BEZERRA *et al.*, 2014), no Parque Nacional da Serra da Capivara-PI (11%) (HERRERA *et al.*, 2005) e em Jaguaruana-CE (21,9%) (SARQUIS *et al.*, 2004).

Em um estudo realizado no Brasil, 50 cães domésticos pertencentes a 30 indivíduos com DC crônica, foram avaliados por métodos diretos e indiretos. Dos 50 animais avaliados, 43 (86%) apresentaram reatividade em algum dos testes utilizados, sendo que 34 animais (68%) apresentaram positividade no xenodiagnóstico e foi possível o isolamento do parasita através de hemocultivo em 30 animais (60%), o que é um indicativo de parasitemia (LUCHEIS *et al.*, 2005).

Segundo um estudo epidemiológico de integração de dados, ocorreram 15 inquéritos sorológicos para a tripanossomíase americana canina no Brasil, avaliando, ao todo, 3.405 cães, sendo que 501 (14.71%) destes, apresentaram positividade em algum teste diagnóstico. Considerando apenas os estudos que se utilizaram de dois testes sorológicos distintos e independentes e/ou métodos diretos, 2182 cães foram analisados e 359 (16.45%) apresentaram resultados positivos (BROWNE *et al.*, 2017). Apenas um estudo ocorreu na Bahia, sendo que o método de diagnóstico foi através de PCR, uma técnica de baixa sensibilidade na fase crônica,

utilizando-se iniciadores de genes ribossômicos, identificando apenas 2 (0.5%) animais com parasitemia, em um total de 272 amostras caninas analisadas.

Cães sorologicamente reagentes para anticorpos IgG anti-*T. cruzi* foram recentemente identificados em colônias de imigrantes localizadas no sul do 1 (EUA), com soroprevalências variando entre 19.6% a 31.6% (CURTIS-ROBLES *et al.*, 2017). Em alguns destes animais, foi detectado kDNA de *T. cruzi* em sangue periférico, indicando parasitemia. Neste estudo, os cães apresentavam parasitemia maior do que àquela relatada em humanos, o que aumenta a sua importância epidemiológica, considerando que a parasitemia sérica é diretamente proporcional à infecciosidade, o que ilustra o potencial papel destes animais como reservatórios biológicos domésticos do *T. cruzi* (CASTILLO-NEYRA *et al.*, 2015).

2.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DC EM CÃES

O diagnóstico da DC em cães apresenta limitações importantes por diversos fatores. A principal limitação está na ausência de testes sorológicos comerciais para a detecção da infecção. Até o momento, os inquéritos sorológicos sobre DC canina disponíveis na literatura científica utilizaram metodologias adaptadas de sistemas de diagnóstico humano ou desenvolvido *in house*, empregando antígenos nativos (Quadro 1). Tais estudos utilizaram predominantemente as técnicas de ELISA e IFI, além de ensaios imunocromatográficos empregando a proteína A ligada à ouro coloidal como conjugado. Desta forma, torna-se desnecessária a utilização de um anticorpo secundário conjugado, que é específico para cada espécie. O *Western blot* (WB) e a HAI também já foram empregados em inquéritos sorológicos em cães, porém com menor frequência, provavelmente por causa da laboriosidade e custo destas metodologias. Ademais, há o problema da reatividade cruzada com outros tripanosomatídeos, como por exemplo o *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma caninum*, *Trypanosoma evansi* ou parasitas do gênero *Leishmania* spp. Como a maior parte dos inquéritos sorológicos utilizaram antígenos nativos, um grande número de reações cruzadas foi observado, especialmente nos locais de co-endemicidade entre o *T. cruzi* e espécies do gênero *Leishmania* spp. (UMEZAWA *et al.*, 2009; VEGA BENEDETTI *et al.*, 2013). Por isso, os inquéritos sorológicos empregaram mais de uma metodologia sorológica para determinar o estado sorológico dos animais analisados, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Detalhamento dos ensaios sorológicos utilizados para determinação da DC em cães em estudos de corte-transversal, bem como a prevalência encontrada para cães e humanos, quando disponíveis.

País	Prevalência (%)		Metodologias sorológicas	Antígeno (ELISA/IC)	Cepa (ELISA/IC)	Referência
	C	H				
AR	40.1	ND	EIA, IFI, HAI	Purificado (Flagelar)	Tulahuen	(LAURICELLA <i>et al.</i> , 1998)
AR	50	ND	EIA, IFI, HAI	Purificado (Flagelar)	Tulahuen	(GÜRTLER <i>et al.</i> , 2007)
AR	11.3	40	EIA, IFI, HAI	Purificado (Flagelar)	Tulahuen	(MONJE-RUMI <i>et al.</i> , 2015)
AR	27.6	47.1	EIA, IFI, HAI	Purificado (Flagelar)	Tulahuen	(MONJE-RUMI <i>et al.</i> , 2015)
BR	37.1	ND	EIA, IFI	ND (Comercial adaptado)	Bio-Manguinhos	(XAVIER <i>et al.</i> , 2012)
BR	29.4	ND	EIA, IFI	ND (Comercial adaptado)	Bio-Manguinhos	(ROCHA <i>et al.</i> , 2013b)
BR	38	ND	EIA, IC, IFI	ND	ND	(BEZERRA <i>et al.</i> , 2014)
BR	47	4.5	EIA, IFI	Lisado/Extrato (Tripomastigota)	ND	(LIMA <i>et al.</i> , 2012)
BR	53	ND	EIA, IFI	ND (Comercial adaptado)	Bio-Manguinhos	(EDITH <i>et al.</i> , 2018)
BR	36.2	ND	EIA, IFI	ND	ND	(XAVIER <i>et al.</i> , 2014)
CL	18.8	ND	EIA	Lisado/Extrato (Tripomastigota)	ND	(GONZALEZ <i>et al.</i> , 2015)
CR	27.7	0	EIA, IFI, HAI	ND (Comercial adaptado)	Biozima Chagas	(MONTENEGRO <i>et al.</i> , 2002)
US	23.9	ND	IC, IFI	Recombinante (Comercial adaptado)	<i>Trypanosoma</i> Detect® e Chagas Stat-Pak	(NIETO <i>et al.</i> , 2009)
US	19.6	1.3	IC, IFI	Recombinante (Comercial adaptado)	<i>Trypanosoma</i> Detect® e Chagas Stat-Pak®	(CURTIS-ROBLES <i>et al.</i> , 2017)
US	14.9	ND	EIA, ALTA	Lisado/Extrato (Epimastigota)	CL-Brener	(SHADOMY; WARING; CHAPPELL, 2004)
GD	4.3	ND	IC	Recombinante (Comercial adaptado)	<i>Trypanosoma</i> Detect®	(ROSY PAL <i>et al.</i> , 2010)
GF	3.9	ND	IC	Recombinante (Comercial adaptado) ¹	Chagas Stat-Pak®	(TAHIR <i>et al.</i> , 2018)
MX	8.8	ND	EIA	Lisado/Extrato (Epimastigota)	ND	(GARCIA-VAZQUEZ <i>et al.</i> , 1995)
MX	24.6	ND	EIA	Lisado/Extrato (Epimastigota)	ND	(GARCIA-VAZQUEZ <i>et al.</i> , 1995)
MX	1.2	ND	EIA, WB	Lisado/Extrato (Tripomastigota)	Cocula	(CAMPOS-VALDÉZ <i>et al.</i> , LABAT, 2001)
MX	10.6	4	EIA, IFI	Lisado/Extrato (Tripomastigota)	Ninoa	(SOSA-JURADO <i>et al.</i> , 2004)
MX	21	7.1	EIA, IFI, HAI	Lisado/Extrato (Tripomastigota)	SylvioX10/4	(ESTRADA-FRANCO <i>et al.</i> , 2006)
MX	17.5	ND	EIA, IFI, HAI	Lisado/Extrato (Tripomastigota)	SylvioX10/4	(ESTRADA-FRANCO <i>et al.</i> , 2006)
MX	9.8	ND	IFI, WB, PCR	Lisado/Extrato (Epimastigota) e comercial adaptado	Chagatest V3.0 (adaptado)	(JIMENEZ-COELLO <i>et al.</i> , 2008)
MX	17.3	ND	EIA, IFI, WB	Lisado/Extrato (Epimastigota) e comercial adaptado	Chagatest V3.0 (adaptado)	(JIMENEZ-COELLO <i>et al.</i> , 2008)
MX	34	8	EIA, IFI, WB	Lisado (Epimastigota) e comercial adaptado	Chagatest V3.0 (adaptado)	(JIMÉNEZ-COELLO <i>et al.</i> , 2010b)
MX	7.6	0.1	EIA, IFI, WB	Lisado/Extrato (Tripomastigota)	Ninoa	(BALAN <i>et al.</i> , 2011)
MX	24.5	ND	EIA, HAI	ND (Comercial adaptado)	Biozima Chagas	(BARBOSA-PLIEGO <i>et al.</i> , 2011)
MX	24.2	1.2	EIA, IFI	Lisado/Extrato (Epimastigota)	CL-Brener, Mor-5, HI, INC-5, NAY	(PORTUGAL-GARCÍA <i>et al.</i> , 2011)
MX	0.34	ND	EIA, HAI	Lisado/Extrato (Epimastigota)	Biozima Chagas	(QUIJANO-HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2012)
MX	8.1	ND	EIA, WB	Lisado/Extrato (Epimastigota) e recombinante	TBAR/MX/0000/Querétaro, HSP90 (Recombinante)	(MARTÍNEZ <i>et al.</i> , 2014)
MX	4.44	ND	EIA, IFI	Lisado/Extrato (Epimastigota)	INC-9	(GONZALEZ <i>et al.</i> , 2015)
PA	11.1	ND	EIA, IFI, WB	Comercial (Adaptado)	Chagatest (Adaptado)	(PINEDA <i>et al.</i> , 2011)
PE	12.7	ND	EIA, WB	Lisado/Extrato (Epimastigota)	Y	(CASTILLO-NEYRA <i>et al.</i> , 2015)
PE	19.8	14.9	EIA, WB	Lisado/Extrato (Epimastigota)	Arequipa	(ALROY <i>et al.</i> , 2015)
VE	61.7	17.8	EIA, IFI	Lisado/Extrato (Epimastigota)	Peru	(CRISANTE <i>et al.</i> , 2006)

Fonte: O autor.

Nota: ALTA: *flow cytometry detection of anti-live trypomastigote antibodies*; AR: Argentina; BR: Brasil; C: Cães; CL: Chile; CR: Costa Rica; EIA: Ensaio de imunoadsorção enzimática; GD: Granada; GF: Guiana Francesa; H: humanos; HAI: ensaio de hemaglutinação indireta; IC: imunocromatografia; MX: México; PA: Panamá; PE: Peru; US: Estados Unidos da América; VE: Venezuela; WB: *Western blot*. Os testes *Trypanosoma* Detect® e CHAGAS STAT-PAK empregam os antígenos ITC-6 e ITC-8.2 e os antígenos B13, 1F8 e H49/JL7 como antígenos, respectivamente.

2.9 ANTÍGENOS IBMP

Os antígenos utilizados neste estudo, denominados IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 (acrônimos para o Instituto de Biologia Molecular do Paraná), foram previamente avaliados em humanos pelo nosso grupo. Trata-se de quatro antígenos quiméricos formados por sequências imunodominantes, conservadas e repetitivas de diversas proteínas do *T. cruzi* (Quadro 2). As proteínas quiméricas IBMP são formadas por sequências antigênicas descritas na literatura (SANTOS, 2016; SANTOS, *et al.*, 2016a, 2016b). Os antígenos foram previamente avaliados quanto ao seu potencial diagnóstico em seres humanos, suas características moleculares, incluindo estabilidade, estado de agregação em diferentes condições de temperatura, força iônica e composição de estrutura secundária também foram analisadas (SANTOS, 2016).

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).

Em um estudo de fase I realizado pelo nosso grupo, utilizando um painel sorológico humano de 280 amostras positivas e 20 negativas para a DC, foi observado que os antígenos IBMP apresentaram elevado poder discriminatório entre amostras positivas e negativas. Este tipo de estudo tem como objetivo analisar a capacidade de um teste em discriminar indivíduos portadores daqueles indivíduos não-portadores do agravo. Nesta avaliação, todos os antígenos obtiveram valores de área abaixo da curva ROC (AUC) que variaram de 98,39% a 99,98%. (SACKETT *et al.*, 2002)

Subsequentemente, os antígenos foram submetidos ao estudo de fase II, um estudo caso-controle, que teve como objetivo analisar a probabilidade de um teste fornecer resultados positivos em indivíduos com o agravo e a probabilidade deste teste em dar um resultado negativo em indivíduos não portadores do agravo (SACKETT *et al.*, 2002). Para esta finalidade, foram avaliadas 857 amostras de indivíduos com a forma crônica da DC, provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil e de países da América Latina, bem como 689 amostras não reagentes. Adicionalmente, foi avaliado um painel de 1.079 amostras reagentes para outras doenças infecto-parasitárias à fim de verificar a ocorrência de reações cruzadas. Neste estudo, a sensibilidade e especificidade variaram de 94,3% a 99,3% e 99,4% a 100%, respectivamente, sendo observado um desempenho diagnóstico superior ao dos testes comerciais disponíveis no Brasil, baixo índice de reatividade cruzada e elevada reprodutibilidade intra-teste, inter-teste e inter-laboratorial.

O nosso grupo recentemente avaliou os antígenos em amostras séricas humanas para o diagnóstico sorológico da DC em indivíduos de diferentes países, endêmicos (DEL-REY e LEONY *et al.*, 2019) e indenes (DOPICO *et al.*, 2019) para o *T. cruzi*, inclusive em cenários onde há coendemicidade com *Leishmania* spp. (DALTRO *et al.*, 2019). Os parâmetros de desempenho dos antígenos quiméricos mantiveram-se dentro do esperado, não apresentando variações estatisticamente significante de performance nos ensaios com amostras humanas.

Levando em consideração o desempenho diagnóstico destes antígenos em ensaios humanos, a importância da DC canina, tanto para o bem-estar dos animais quanto para a avaliação epidemiológica, além do papel do cão como reservatório e/ou sentinela biológico e a ausência de testes comercialmente disponíveis para DC em cães, fica evidente a existência de uma lacuna tecnológica, o que nos motivou a explorar a aplicabilidade destas moléculas em ensaios sorológicos para o diagnóstico da DC crônica em cães.

3 OBJETIVOS PROPOSTOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e validar a utilização das proteínas quiméricas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em cães.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e otimizar os testes imunoenzimáticos no formato ELISA indireto utilizando as proteínas de *T. cruzi* quiméricas IBMP-8.1, -8.2, -8.3 e -8.4;
- Avaliar o desempenho diagnóstico dos ensaios imunoenzimáticos utilizando as proteínas quiméricas IBMP-8.1, -8.2, -8.3 e -8.4 através de soros de cães positivos e negativos para a DC;
- Avaliar a reatividade cruzada das proteínas quiméricas IBMP-8.1, -8.2, -8.3 e -8.4 frente a amostras séricas de cães portadores de diferentes doenças infecto-parasitárias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de validação de métodos, o qual refere-se ao processo que determina o desempenho de um ensaio que foi desenvolvido, otimizado e padronizado para um determinado objetivo. Estudos de validação de métodos estabelecem parâmetros de desempenho, proporcionando dados úteis sobre a capacidade do ensaio, em termos qualitativos e quantitativos, distinguindo com segurança amostras positivas e negativas para um determinado agravo (BANO *et al.*, 2006). Para o estabelecimento de sua validade, os resultados são comparados àqueles obtidos a partir de um padrão-ouro que, para a doença de Chagas crônica, é um conjunto de exames julgados adequados.

4.2 LOCAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E PROCEDIMENTOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios Avançado de Saúde Pública (LASP, Instituto Gonçalo Moniz - IGM /FIOCRUZ-BA), de Genômica e de Proteínas (Instituto Carlos Chagas - ICC/FIOCRUZ-PR) e no de Biologia de Tripanosomatídeos (LABTRIP, Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ-RJ). A produção e purificação dos antígenos quiméricos IBMP foram realizadas nos Laboratórios de Genômica e de Proteínas. A caracterização do painel sorológico ocorreu no LASP e no LABTRIP. Por fim, a avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos, incluindo a padronização e a otimização dos imunoenaios pela metodologia de ELISA, foi realizada no LASP.

4.3 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Os antígenos IBMP são compostos por sequências imunodominantes de antígenos já relatados na literatura para diagnóstico da DC (Quadro 2). Os detalhes das construções e dos processos de purificação não serão apresentados devido à confidencialidade industrial e por estarem sob proteção patentária (Número do registro: BR10201801614). A quantificação das moléculas foi realizada por fluorimetria utilizando o equipamento Qubit 2.0 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). Esta metodologia utiliza corante fluorescente que emite sinais quando ligado às proteínas, ainda que na presença de contaminantes de outra natureza. As amostras de interesse foram misturadas à solução

fornecida pelo fabricante, incubadas por 2 minutos e a fluorescência emitida determinada pelo equipamento.

4.4 ANÁLISE DA INTEGRIDADE MOLECULAR ATRAVÉS DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)

A pureza e a integridade dos antígenos recombinantes foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Alíquotas dos antígenos IBMP (1µg/poço) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) à 15%. Os géis de concentração (*stacking gel*) e de separação (*running gel*) foram preparados a uma concentração de acrilamida de 4,5% e 15%, respectivamente. Os antígenos foram avaliados submetendo o gel à coloração pelo Coomassie Blue R250 (Bio-Rad, EUA). Como marcador de peso molecular foi utilizado o Kaleidoscope™ Prestained Standards (BioRad, EUA).

4.5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO INICIAL DOS PAINÉIS SOROLÓGICOS

As amostras séricas foram oriundas de Instituições parceiras, localizadas em diferentes regiões do Brasil (Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Pernambuco). As amostras oriundas de Minas Gerais foram obtidas graças à colaboração do nosso grupo com a Dra. Claudia Martins Carneiro, do Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). A Dra. Cláudia Carneiro desenvolve projetos sobre a eficácia de medicamentos tripanocidas e inovação terapêutica na DC, utilizando o cão como modelo experimental. Desta maneira, as amostras foram oriundas de animais criados em canil livres de doenças infectocontagiosas, experimentalmente infectados com as cepas Berenice (Tc II), Colombiana (Tc I) e Y (Tc II) do *T. cruzi*, além de animais naturalmente e experimentalmente infectados com *Leishmania infantum*. Somente amostras de animais que apresentaram parasitemia na fase aguda foram selecionados para a realização deste estudo. As amostras foram colhidas nos períodos de 2, 6 e 15 meses após a infecção, assegurando uma amostragem desde o início da fase crônica da DC. As amostras de Pernambuco foram oriundas do Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-Fiocruz/PE) através de colaboração com o Dr. Felipe Dantas-Torres. Estas amostras foram previamente testadas para *Leishmania*

spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Dirofilaria* spp. Para avaliar a infecção causada por *Leishmania* spp. o grupo do Dr. Dantas-Torres utilizou o teste rápido SNAP® Leishmaniasis Test (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, EUA), a PCR em tempo real (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017; FRANCINO *et al.*, 2006) e o DPP® Canine Visceral Leishmaniasis (Bio-Manguinhos, Fiocruz-RJ, Brasil). Para avaliação da infecção causada por *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Dirofilaria* spp. foram utilizados o teste rápido SNAP® 4Dx Plus Test (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, E.U.A.) e as reações convencionais da PCR para *Anaplasma platys* (BEALL *et al.*, 2008) e *Ehrlichia canis* (OTRANTO *et al.*, 2010). As amostras da Bahia, cedidas pela Dra. Déborah Bittencourt Mothé Fraga, do Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia (IGM/Fiocruz-BA), foram provenientes de estudos de corte transversal realizados no município de Camaçari para avaliar a presença da leishmaniose visceral canina. Os animais foram avaliados clinicamente e as amostras testadas através de testes moleculares e sorológicos. Todas as amostras utilizadas no estudo foram caracterizadas quanto à presença de IgG anti-*T. cruzi* por dois ensaios imunoenzimáticos (ELISA), empregando ensaios com antígenos distintos, seguindo como base às recomendações da OMS e do Ministério da Saúde do Brasil para o diagnóstico da DC em humanos. As amostras cedidas pelo Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC, Rio de Janeiro) foram provenientes de estudos de inquérito sorológico naquele estado. Todas as amostras foram testadas no Labtrip para *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, através de ELISA e IFI (*in house*).

Todos os painéis sorológicos utilizados neste estudo foram recharacterizados no LASP quanto à sororeatividade para *T. cruzi*, empregando o Gold ELISA Chagas® (REM diagnóstica, São Paulo) adaptado para cães e o teste imunocromatográfico DPP® Canine Visceral Leishmaniasis (Bio-Manguinhos, Fiocruz-RJ, Brasil) para *Leishmania* spp.

4.6 DEFINIÇÃO DO PADRÃO-OURO

Para casos humanos, o Ministério da Saúde preconiza que o diagnóstico laboratorial da DC crônica seja conduzido utilizando-se dois testes sorológicos com antígenos distintos (DIAS *et al.*, 2016). Entretanto, não há testes comerciais ou recomendações específicas para o diagnóstico da DC crônica em cães. Desta maneira, o padrão-ouro utilizado neste estudo foi estabelecido seguindo as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil para o diagnóstico para DC em humanos (DIAS *et al.*, 2016). Logo, a combinação dos resultados obtidos através

de dois testes sorológicos, com antígenos distintos, foi considerada como padrão-ouro neste estudo, sendo aceitas as caracterizações das amostras que preenchessem os requisitos abaixo:

Amostras positivas para a DC: Todas aquelas com resultados positivos no ELISA *in-house* (lisado do *T. cruzi*) e no Gold Elisa Chagas® (Rem, São Paulo, Brasil) adaptado (extrato de cepas brasileiras e antígenos recombinantes).

Amostras negativas para a DC: Todas aquelas com resultados negativos no ELISA *in-house* (lisado do *T. cruzi*) e no Gold Elisa Chagas® (Rem, São Paulo, Brasil) adaptado (extrato de cepas brasileiras e antígenos recombinantes). A presença ou ausência de reatividade no teste rápido para leishmaniose (DPP® LVC Bio-Manguinhos, Brasil) não foi levada em consideração na definição de amostras negativas para a DC.

Amostras para avaliação de reação-cruzada: Todas aquelas com resultados negativos no ELISA *in-house* (lisado do *T. cruzi*) e no Gold Elisa Chagas® (REM, São Paulo, Brasil) adaptado (extrato de cepas brasileiras e antígenos recombinantes) e reagentes para uma das doenças infecto-parasitárias analisadas no estudo de reação cruzada (babesiose, anaplasiose, erliquiose, dirofilariose e leishmaniose).

4.7 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas neste estudo amostras séricas de cães sorologicamente concordantes em ambos os testes empregados para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* conforme definições previamente estabelecidas.

4.8 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas deste estudo as amostras séricas de cães que apresentaram volumes inferiores a 50 µl e aquelas com avaliação sorológica discordante para a doença de Chagas. Este último critério refere-se aos resultados inconclusivos entre os testes de referência adotados neste estudo, ou seja, amostras com resultado positivo em um teste e negativo no outro e amostras com resultado na zona cinza em um ou ambos os testes.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DO PAINEL AMOSTRAL

A caracterização do painel amostral foi realizada através de testes sorológicos e moleculares, conforme descrito abaixo:

4.9.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Ensaio de biologia molecular foram realizados para caracterização das amostras quanto a presença de formas do *T. cruzi* circulantes. Para esta finalidade foram utilizados os iniciadores TcH2AR (5' AGT GGC AGA CTT TGG GGT C 3') e TcH2AF (5' GAG AGT GAT CGT GGG AGA GC 3'), cujo alvo de amplificação foi um segmento do gene de histona TcH. Para a amplificação foi utilizado o kit Taq PCR Master Mix[®] (Quiagen[™], EUA). Como controle positivo e negativo foram empregados, respectivamente, um extrato nativo do *T. cruzi* cepa 21SF e o PCR Master Mix (Quiagen[™], EUA). Foi utilizado 1.5 µl de DNA de sangue total para o ensaio em uma concentração de 100 ng/µl. A termociclagem ocorreu em um termociclador Eppendorf[™] MasterCycler Gradient[®] (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Foram usados 30 ciclos com desnaturação à 94° C, anelamento à 60° C e alongamento à 72° C. A visualização das amplificações foi realizada em matriz de agarose à 2% corada com SyBR Safe[®] (Invitrogen, EUA). A eletroforese foi realizada por 30 minutos à 100 V em cuba horizontal (LCH 12×14 Loccus, SP, Brasil) contendo tampão TBE 1x.

4.9.2 Gold Elisa Chagas[®] adaptado

O protocolo do ensaio imunoenzimático indireto do Gold ELISA Chagas[®], que se utiliza de lisado de cepas brasileiras e antígenos recombinantes, foi adaptado e padronizado de forma a determinar a quantidade ótima de soro e do anticorpo secundário, através de *checkerboard titration*. Para a padronização do ensaio, foram utilizadas em duplicata amostras séricas de quatro cães negativos e três positivos para a doença de Chagas nas diluições de 1:10, 1:40, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600 e 1:3.200 utilizando o tampão PBS pH 7.4 (fosfato de sódio 10 mM - Na₃PO₄ e cloreto de sódio 150 mM - NaCl) como diluente. Um total de 100 µl das amostras séricas previamente diluídas foram adicionadas a cada poço. As placas foram seladas e incubadas em estufa a 37° C por 30 min (MARCONI[®] MA032, São Paulo, Brasil). Ao final desta etapa, as microplacas foram lavadas cinco vezes com adição de 300 µl de tampão PBS-Tween (fosfato de sódio 10 mM - Na₃PO₄, cloreto de sódio 150 mM - NaCl e Tween-20 0,5%)

para retirada de material não adsorvido. Em seguida, foram adicionados 100 µl do anticorpo secundário diluído em PBS pH 7.4 em cada poço. O anticorpo secundário, lote 156EXCJHP006Z, foi conjugado à peroxidase no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ-RJ) e gentilmente cedido para a realização deste estudo. Trata-se de uma anti-imunoglobulina G de cão (anti-IgG) produzida a partir da inoculação de IgG canina em cabra. Para a padronização da reação de ELISA, o anticorpo secundário foi avaliado nas diluições de 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000. As microplacas foram novamente seladas e incubadas em estufa a 37° C por 30 minutos (MARCONI[®] MA032, São Paulo, Brasil). Ao final da incubação, as microplacas foram lavadas conforme descrito anteriormente. A cada poço foram adicionados 100 µl do cromógeno TMB Plus (lote 111011, Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) e, após 10 minutos e sob abrigo da luz, adicionou-se 50 µl de H₂SO₄ à 0,3 M com objetivo de interromper as reações, as quais foram quantificadas em espectrofotômetro com filtro de 450 nm (SPECTRAMax 340PC[®], EUA). Para a interpretação dos dados, os valores de densidade ótica (DO) obtidos dos poços denominadas branco foram subtraídos das DO das amostras. Em seguida as médias aritméticas dos valores das DO das amostras positivas e negativas foram calculadas, bem como os seus respectivos desvios padrão, utilizando o programa Microsoft Excel 2010. Os critérios estabelecidos para a determinação das condições ótimas basearam-se na maior distância entre a média aritmética das DO das amostras positivas daquela obtida para as amostras negativas acrescida à três desvios padrão (DP). Como critério de aceitação, foi estabelecido pelo nosso grupo que a média aritmética das DO das amostras positivas deveriam obrigatoriamente ultrapassar valores de 1.000 enquanto que a das negativas não deveria atingir o valor de 0.250.

Após padronização, os ensaios foram realizados adicionando 100 µl das amostras séricas previamente diluídas (1:800) aos poços das microplacas, as quais foram seladas com filme adesivo e incubadas por 30 minutos a 37° C. Depois da incubação, as placas foram esvaziadas por inversão e lavadas 5 vezes com a solução de lavagem PBS-Tween para retirada de material não adsorvido. Em seguida, 100 µl do anticorpo secundário anti-IgG canina na diluição de 1:40.000 foram adicionados aos poços. As microplacas foram novamente incubadas a 37° C por 30 minutos. Após nova etapa de lavagem, foram adicionados 100 µl do substrato, ocorrendo revelação da coloração após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente na ausência de luz. Os períodos de incubação dos reagentes foram baseados no protocolo original do kit para humanos. Por fim, as reações foram interrompidas com adição de 50 µl de solução de parada (H₂SO₄ 0,3 M) e quantificadas a 450 nm no equipamento Multiskan[®] FC (Thermo Scientific[™],

Finlândia). A determinação do ponto de corte foi realizada através da fórmula abaixo. As amostras indeterminadas foram aquelas que apresentaram um sinal entre $\pm 20\%$ do valor do ponto de corte.

$$\text{Ponto de corte} = (\bar{x} \text{ controles negativos}) + 3DP$$

4.9.3 ELISA *in-house* LABTRIP (lisado de *Trypanosoma cruzi*)

Este protocolo foi desenvolvido pelo Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (LABTRIP), para o diagnóstico sorológico da DC em cães. As microplacas foram sensibilizadas por 1 hora à 37° C (Incubadora de Microplacas, NI 1720, Novainstruments Equipamentos para Laboratórios Ltda, Piracicaba, Brasil) com o lisado semi-purificado de *T. cruzi*, cepa Y (DTU TcII), na concentração de 2.4 µg/ml (100 µl/poço) diluído em tampão de sensibilização (carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6). Este lisado foi obtido através de centrifugação, o *pellet* com restos celulares foi descartado e o sobrenadante foi utilizado na sensibilização das placas. Em seguida, as microplacas foram lavadas três vezes com tampão PBS-Tween (fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e Tween-20 0,5%) com 2% de leite desnatado, para remoção de material não adsorvido e bloqueio dos sítios, respectivamente. Após sensibilização, 100 µl das amostras séricas diluídas 1:100 em tampão PBS contendo 2% de leite desnatado foram adicionadas a cada poço e as microplacas foram incubadas à 37° C por 30 minutos (Incubadora de Microplacas, NI 1720). As microplacas foram então lavadas 6 vezes com tampão PBS-Tween com 2% de leite desnatado, sendo em seguida adicionados 100 µl do anticorpo secundário anti-IgG de cão na diluição de 1:40.000 (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ) em tampão PBS com 2% de leite desnatado. As microplacas foram novamente incubadas a 37° C por 30 minutos (Incubadora de Microplacas, NI 1720). Após nova etapa de lavagem, foram adicionados 100 µl do cromógeno (TMB, Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca), ocorrendo revelação da coloração após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente na ausência de luz. Por fim, as reações foram interrompidas com adição de 50 µl de solução de parada (H₂SO₄ 2 M) e quantificadas a 450 nm no fotômetro de microplacas Multiskan® FC (Thermo Scientific™, Finlândia). As amostras indeterminadas foram aquelas que apresentaram sinal entre o ponto de corte variando até $\pm 10\%$ do valor do ponto de corte. A determinação do ponto de corte foi realizada através da fórmula abaixo:

$$\text{Ponto de corte} = (\bar{x} \text{ controles negativos}) * 2$$

4.9.4 Teste rápido para leishmaniose

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram submetidas ao teste rápido para leishmaniose (DPP[®] LVC Bio-Manguinhos, Brasil). As reações foram realizadas conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, 5 µl de cada amostra foram transferidos ao poço #1 (AMOSTRA + TAMPÃO), sendo seguida da adição de duas gotas do tampão da amostra. Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionadas 4 gotas do tampão da amostra ao poço #2 (TAMPÃO) e as reações analisadas após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente. Uma reação foi considerada positiva após o aparecimento de banda visível formada na linha teste. Todas as reações foram validadas após o aparecimento de banda na linha controle.

4.10 DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL

Trata-se de um estudo de fase I para validação de métodos, sendo portando exploratório com objetivo de avaliar se os antígenos são capazes de diferenciar entre cães portadores da DC dos não portadores. Por conta das características deste tipo de estudo, a amostragem utilizada é de conveniência, não havendo a necessidade, portanto, da determinação do tamanho amostral, sendo esta obrigatória em estudos de fase II e III (SACKETT *et al.*, 2002).

4.11 PADRONIZAÇÃO DO ELISA IBMP INDIRETO

Os ensaios imunoenzimáticos indiretos foram padronizados de forma a determinar a quantidade ótima dos antígenos IBMP-8.1, -8.2, -8.3 e -8.4, bem como a melhor diluição do anticorpo secundário e das amostras séricas, utilizando uma matriz de decisão ou *checkerboard titration*. Esta matriz baseia-se no cruzamento das variáveis utilizadas no ajuste do teste, com objetivo de identificar as melhores condições de reatividade para cada proteína na plataforma proposta. Em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Nunc MaxiSorp[®], EUA) foram distribuídos 100 µl da solução tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6) contendo quantidades distintas dos antígenos recombinantes (50, 25 e 12,5 ng por poço). Cada antígeno foi utilizado separadamente como antígeno de captura de IgG anti-*T. cruzi*, não exploramos

misturas antigênicas neste estudo. Após adição dos antígenos, a sensibilização ocorreu através do acréscimo de 100 µl da solução WellChampion™ (lote 130703; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) por poço.

Após um período de incubação de 15 min à temperatura ambiente, as microplacas foram esvaziadas por inversão e colocadas em estufa a 37° C por 3 horas para secagem (MARCONI® MA032, São Paulo, Brasil). Condições distintas de sensibilização na presença e ausência de WellChampion™ também foram avaliadas, mas não superaram o desempenho do protocolo de sensibilização utilizado neste estudo. Ao final da secagem, as microplacas encontravam-se prontas para uso ou armazenagem. Para a padronização do ELISA indireto foram utilizadas em duplicata amostras séricas de quatro cães negativos e três positivos para a doença de Chagas nas diluições de 1:100 e 1:200 vezes utilizando o tampão PBS pH 7.4 (fosfato de sódio 10 mM e cloreto de sódio 150 mM). Seis poços sem adição de antígeno (somente tampão de diluição) e seis sensibilizadas com o antígeno, porém, sem adição de amostra sérica (“branco”) foram utilizadas para análise do sinal de *background* do tampão e dos antígenos, respectivamente.

Depois da sensibilização, 100 µl das amostras previamente diluídas foram adicionadas em cada poço. As placas foram seladas e incubadas em estufa a 37° C por 60 min (MARCONI® MA032, São Paulo, Brasil). Ao final desta etapa, as placas foram lavadas cinco vezes com adição de 300 µl de tampão PBS-Tween (fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e 0,5% de Tween-20) para retirada do material não adsorvido. Em seguida, foram adicionados 100 µl do anticorpo secundário diluído em PBS em cada poço. O anticorpo secundário, lote 156EXCJHP006Z, foi conjugado à peroxidase no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ-RJ) e gentilmente cedido para a realização deste estudo. Trata-se de uma anti-globulina de cão (anti-IgG) produzida a partir da inoculação de IgG canina em cabra. Para a padronização da reação de ELISA, o anticorpo secundário foi avaliado nas diluições de 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000. As microplacas foram novamente seladas e incubadas em estufa a 37° C por 30 minutos (MARCONI® MA032, São Paulo, Brasil). Ao final da incubação, as microplacas foram lavadas conforme descrito anteriormente. A cada poço foram adicionados 100 µl do cromógeno TMB Plus (lote 111011; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) e, após 10 minutos de incubação sob abrigo da luz, adicionou-se 50 µl de H₂SO₄ 0.3 M com objetivo de interromper as reações, as quais foram quantificadas em espectrofotômetro com filtro de 450 nm (SPECTRAMax 340PC®, EUA). Para a interpretação dos dados, os valores da densidade ótica (DO) obtidos dos poços denominadas branco foram subtraídas das DO das amostras. Em seguida as médias aritméticas

dos valores das DO das amostras positivas e negativas foram calculadas, bem como os seus respectivos desvios padrão, utilizando o programa Microsoft Excel 2010.

Dois critérios foram estabelecidos para determinar as condições ótimas na padronização do ensaio, respeitando o princípio da economia e eficiência. A primeira condição desejável para o ensaio definiu que a média das DO das amostras positivas apresentasse sinal superior ou próximo de 1.000 e o das amostras negativas abaixo ou próximo 0.250 (Figura 9). O segundo critério utilizado baseou-se na maior diferença entre as DOs médias dos *pools* das amostras positivas e as médias dos *pools* das amostras negativas, acrescidas de 3 desvios padrões.

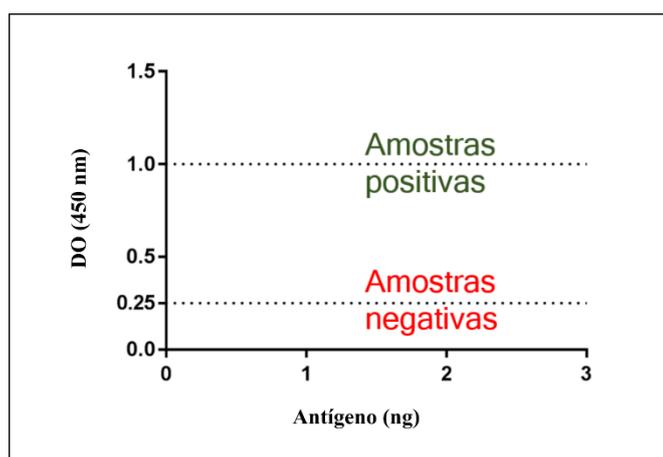


Figura 9 - Determinação das condições aceitáveis para a padronização dos testes de ELISA indireto usando os antígenos IBMP.

Legenda: DO (densidade óptica).

4.12 EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.12.1 Normalização dos dados

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

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

Foram consideradas negativas todas amostras com IR inferior a 1,00 e positivas todas aquelas com o IR igual ou superior a 1,00. Com o objetivo de evitar erros de pipetagem, foi

adotado como critério de repetição todas as amostras com IR entre 0,80 e 1,20, independente da condição sorológica como positiva ou negativa para a DC. Os IR foram representados em gráficos obtidos pelo programa computacional GraphPad Prism v. 7.01 (GraphPad Software Inc., EUA).

4.12.2 Cálculo do índice Kappa

A concordância entre os testes de referência e o IBMP-ELISA foi estabelecida pela análise de Kappa de Cohen (κ). Esta medida tem como valor máximo 1,00 que representa concordância total entre as avaliações e valor mínimo zero, indicando ausência de concordância entre as avaliações. O índice κ foi interpretado da seguinte forma: $\kappa = 1,0$ (concordância perfeita), $0,99 \leq \kappa < 0,81$ (concordância quase perfeita), $0,80 \leq \kappa < 0,61$ (concordância substancial) $0,60 \leq \kappa < 0,41$ (concordância moderada), $0,40 \leq \kappa < 0,21$ (concordância justa), $0,20 \leq \kappa < 0$ (concordância leve) $\kappa = 0$ (concordância fraca). Os valores do índice κ e respectivos intervalos de confiança a 95% (IC95%) foram calculados como descrito abaixo, sendo que P_o representa a probabilidade observada e P_e a probabilidade esperada:

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

4.12.3 Definição do ponto de corte (CO - cut-off e AUC)

Os pontos de corte foram calculados individualmente para cada microplaca. Os valores das DO foram exportados para o programa computacional GraphPad Prism v. 7.01 (GraphPad Software Inc., EUA) e o CO definido a partir da análise da curva ROC. A área abaixo da curva ROC (AUC) foi calculada considerando um intervalo de confiança de 95%. As áreas sob a curva ROC foram determinadas para avaliar a precisão global para cada antígeno IBMP, que pode ser classificado como excelente (1,0), elevado (0,99-0,82), moderado (0,81-0,62) ou baixo (0,61-0,51).

4.12.4 Avaliação dos parâmetros de desempenho

A avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos foi conduzida através do uso de parâmetros que comumente descrevem o desempenho de um teste diagnóstico, como sensibilidade, especificidade, acurácia e razões de verossimilhança, juntamente com seus intervalos de confiança, como recomendado pelo guia de desenvolvimento de testes imunológicos para a DC (OMS, 2010a). Para a obtenção destes dados, foram utilizadas tabelas de dupla entrada (Figura 10) relacionando os resultados obtidos através da utilização dos antígenos IBMP com aqueles obtidos através do padrão-ouro anteriormente definido.

		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 10 - Combinação binária entre os prováveis resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.

Fonte: Santos (2016).

Nota: Tabela de dupla entrada ou 2 x 2.

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

A partir desta tabela, dados importantes para o cálculo dos parâmetros de desempenho podem ser quantificados, tais como:

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

Desta forma, a sensibilidade (Sen) é definida como a probabilidade de um resultado ser positivo pelo teste dentre as amostras com IgG anti-*T. cruzi*, demonstrando assim o total de acertos sobre o verdadeiro número de amostras positivas. Evidentemente, quanto mais próxima de 1 (ou 100%) estiver a sensibilidade, melhor será o desempenho de teste. Esta probabilidade condicional é definida entre os indivíduos doentes e é estimada conforme a fórmula abaixo:

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

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

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

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

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

NDo = número de doentes

NSa = número de sadios

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

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

4.12.5 Testes estatísticos

A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de medidas descritivas como: médias aritmética e geométrica, desvio padrão e coeficiente de variação. As médias geométricas foram calculadas com os seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC95%). As médias aritméticas foram utilizadas para a padronização dos componentes do ELISA. Para as demais análises foi utilizada a média geométrica. Para testar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk e, quando da rejeição da hipótese nula, foi utilizado o teste de Wilcoxon. No caso de confirmação da normalidade dos dados foi utilizado o teste T de Student pareado. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de $p < 0,05$. A ausência de sobreposição dos valores dos IC95% foi considerada como uma significância estatística. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 7.01 (GraphPad Software Inc., EUA) para Windows 7 para realização dos testes estatísticos.

4.13 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS IBMP

4.13.1 Estudo de fase I

O objetivo deste estudo foi determinar a capacidade que os antígenos IBMP possuem em discriminar as amostras sorologicamente positivas para a DC daquelas negativas. Para tal, foi utilizado um painel sorológico caracterizado, respeitando as definições de amostras positivas e negativas para a DC previamente estabelecidas. As reações de ELISA foram conduzidas conforme descrito anteriormente. As médias geométricas dos IR, bem como os parâmetros de desempenho, foram determinados para cada um dos antígenos.

4.13.2 Reações cruzadas

A investigação de possíveis reações cruzadas foi conduzida através da utilização de amostras séricas de cães portadores de doenças infecto-parasitárias, porém negativas para a DC, sendo elas: erliquiose, babesiose, leishmaniose, anaplasmosse e dirofilariose. As reações de ELISA foram conduzidas conforme descritas anteriormente e as médias geométricas dos IR foram determinadas para cada um dos antígenos.

RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA INTEGRIDADE MOLECULAR ATRAVÉS DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)

A análise eletroforética dos antígenos IBMP mostrou a presença de bandas distintas de proteínas com mobilidade relativa compatível com os pesos moleculares para os pesos esperados de cada proteína e ausência de contaminantes (Figura 11).

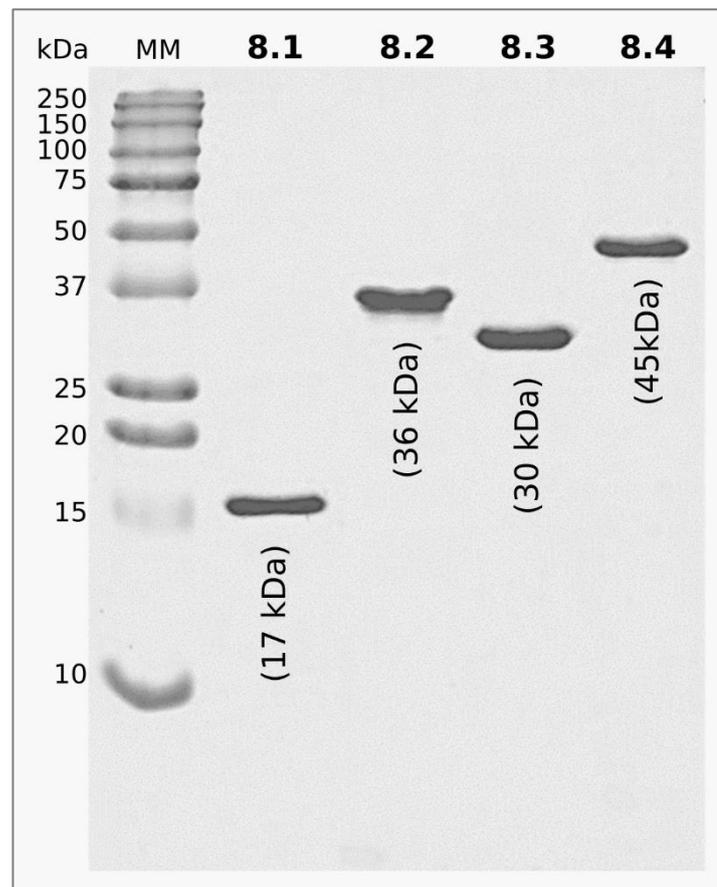


Figura 11 - SDS-PAGE dos antígenos IBMP.

Fonte: O autor.

Legenda: kDa (Kilodaltons); MM (Marcador de Peso Molecular).

Nota: Em cada poço foi depositado 1 μ g do antígeno.

5.2 CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL

As amostras séricas que compuseram o painel sorológico foram cedidas por Instituições parceiras e encaminhadas ao LASP (Figura 12), sendo que estas foram reavaliadas para a presença ou ausência de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. Não obtivemos sensibilidade satisfatória na PCR para o seu emprego como teste coadjuvante na recharacterização das amostras. As amostras negativas para a DC e positivas para as demais doenças infecto-parasitárias foram avaliadas para verificação da possibilidade de co-infecção com a DC. Do quantitativo de 291 amostras recebidas, 246 (84,54%) participaram do estudo e 45 (15,46%) foram excluídas por não preencherem os critérios de inclusão previamente estabelecidos pelo nosso grupo.

As amostras que participaram deste estudo foram divididas em três painéis distintos e um painel combinado. O painel 1 foi composto por amostras de cães criados em canil e experimentalmente infectados com cepas conhecidas de *T. cruzi*. Adicionalmente este painel também foi composto por cães nascidos no canil e livres de quaisquer doenças infecciosas. O segundo painel foi composto por animais de campo, oriundos de áreas endêmicas tanto para *T. cruzi* quanto para *Leishmania* spp., naturalmente infectados e sorologicamente não reagentes para *T. cruzi*. O painel 3 foi composto de amostras de cães de campo, naturalmente infectados com diversas doenças infecto-parasitárias (babesiose, erliquiose, leishmaniose dirofilariose e anaplasnose) à fim de analisar a ocorrência de reações cruzadas entre outras infecções frente aos antígenos quiméricos.

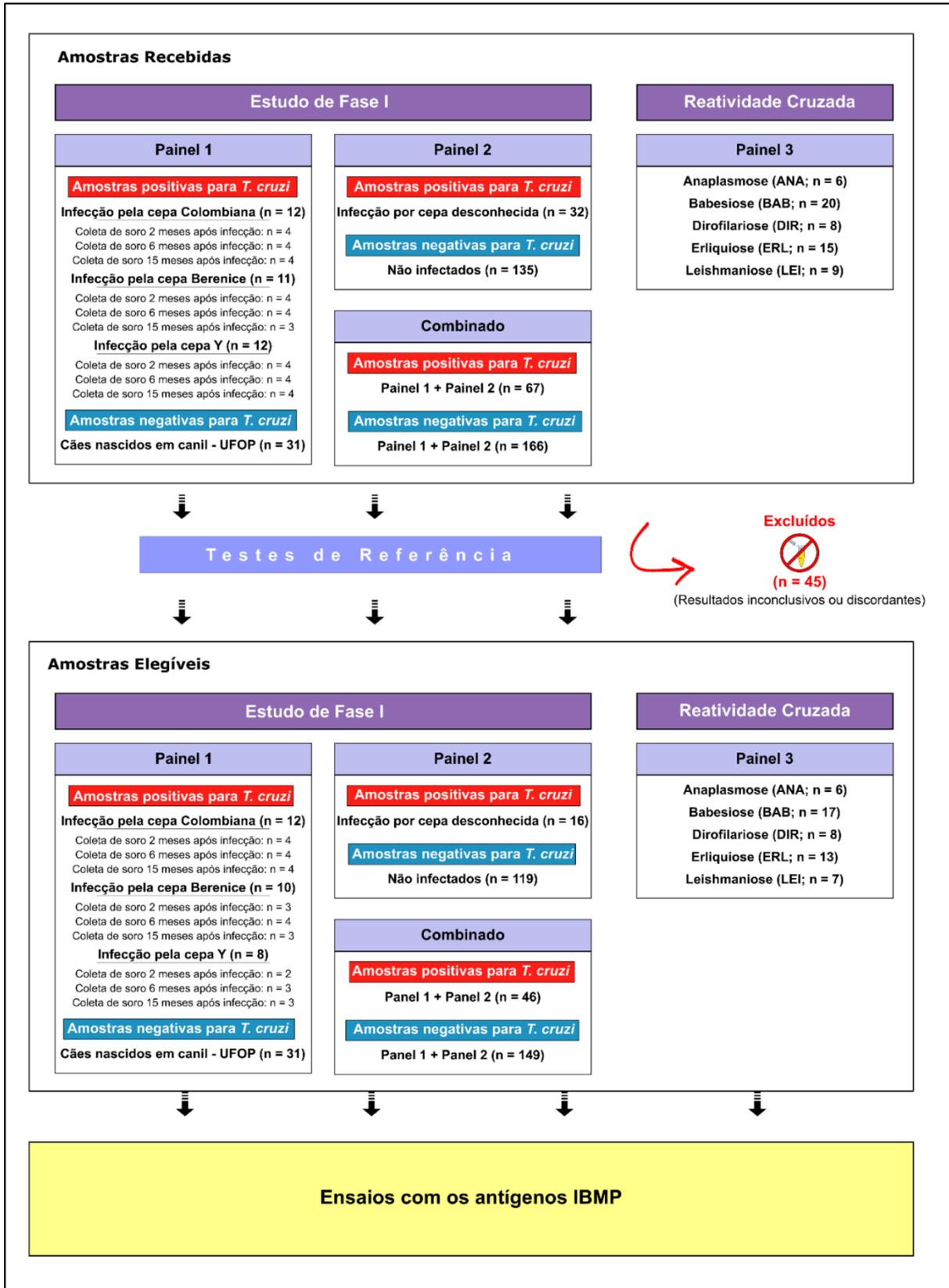


Figura 12 - Painel sorológico das amostras utilizadas para avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos IBMP.

Fonte: O autor.

5.3 PADRONIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO IBMP-ELISA INDIRETO

As diluições do soro, antígenos e do anticorpo conjugado foram avaliadas por uma matriz de decisão (*checkerboard titration*). A melhor condição foi escolhida considerando as preconizações anteriormente descritas. Os critérios pré-estabelecidos foram classificados como satisfatórios com o anticorpo conjugado em uma diluição de 1:20.000 para IBMP-8.2 e 1:40.000 para antígenos quiméricos IBMP-8.1, IBMP-8.3 e IBMP-8.4. Com relação à diluição sérica, todos os testes apresentaram Δ mediana mais alta quando diluídos na razão de 1:100 em comparação a 1:200. Em relação à quantidade de antígenos por poço, a melhor condição para a sensibilização das placas variou entre 25 ng por poço para o IBMP-8.1, IBMP-8.2 e IBMP-8.4 e 50 ng para o antígeno IBMP-8.3.

Para a molécula IBMP-8.1, a maior diferença encontrada entre a média aritmética do sinal (DO) das amostras positivas e a média aritmética do sinal das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi encontrada ao utilizar 25 ng do antígeno por poço somada à diluição sérica de 100 vezes e do conjugado de 40.000 (Figura 13; Tabela 1).

Para a molécula IBMP-8.2, a maior diferença encontrada entre a média aritmética da DO das amostras positivas e a média aritmética do sinal das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi encontrada ao utilizar 25 ng do antígeno por poço somada à diluição sérica de 100 vezes e do conjugado de 20.000 (Figura 14; Tabela 2).

Para a molécula IBMP-8.3, a maior diferença encontrada entre a média aritmética da DO das amostras positivas e a média aritmética do sinal das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi encontrada ao utilizar 50 ng do antígeno por poço somada à diluição sérica de 100 vezes e do conjugado de 40.000 (Figura 15; Tabela 3).

Para a molécula IBMP-8.4, a maior diferença encontrada entre a média aritmética da DO das amostras positivas e a média aritmética do sinal das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi encontrada ao utilizar 25 ng do antígeno por poço somada à diluição sérica de 100 vezes e do conjugado de 40.000 (Figura 16; Tabela 4).

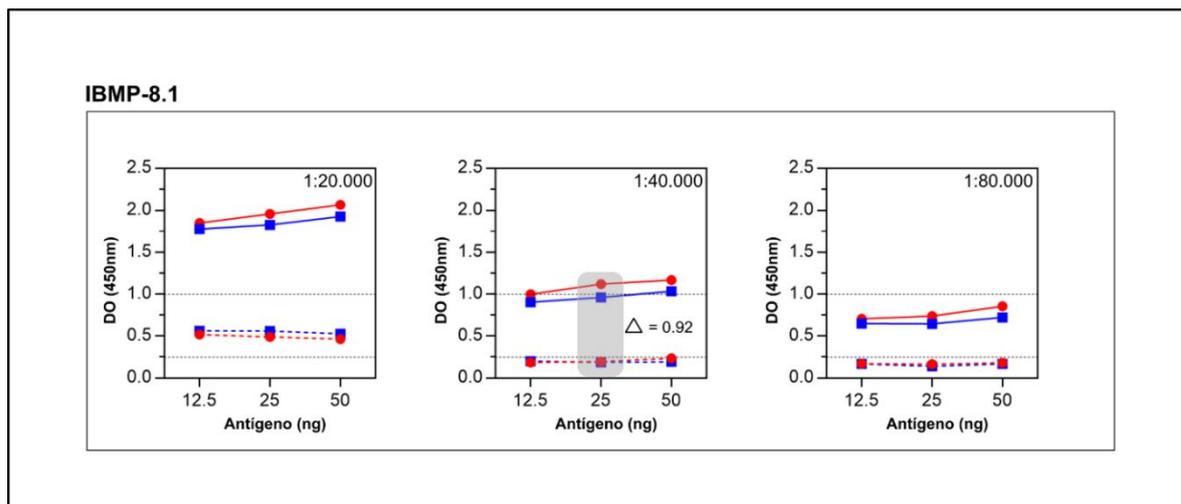


Figura 13 - Análise gráfica dos valores médios de absorvância do antígeno IBMP-8.1.

Fonte: O autor.

Nota: Análise gráfica dos valores médios de absorvância do antígeno IBMP-8.1, variando a diluição sérica de 100 e 200 vezes e a diluição do conjugado de 20.000, 40.000 e 80.000 vezes, com 50, 25 e 12,5 ng do antígeno. As linhas tracejadas inferiores representam o limite máximo requerido para o conjunto de amostras negativas (0.250). As linhas tracejadas superiores representam o limite mínimo desejável de densidade ótica para as amostras positivas (1.000). As linhas vermelhas correspondem à uma diluição de 1:100. As linhas azuis correspondem à uma diluição de 1:200. As linhas vermelhas e azuis contínuas representam os sinais das amostras positivas. As linhas vermelhas e azuis tracejadas representam as amostras negativas. Os pontos vermelhos, simbolizados com círculos “●” representam os valores médios obtidos para amostras na diluição 1:100. Os pontos azuis, simbolizados com quadrados “■” representam os valores médios obtidos para amostras na diluição 1:200.

Legenda: DO (densidade óptica); ng (nanograma).

Tabela 1 - Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao antígeno IBMP-8.1.

Conjugado	Antígeno	Soro	\bar{X} NEG	DP	\bar{X} NEG+3DP	\bar{X} POS	$(\bar{X} \text{ POS}) - (\bar{X} \text{ NEG} + 3 \text{ DP})$
1:20.000	50ng	1:100	0.4665	0.2414	1.1907	2.0671	0.8764
		1:200	0.5302	0.1619	1.0159	1.9255	0.9095
	25ng	1:100	0.4932	0.1775	1.0257	1.9572	0.9315
		1:200	0.5620	0.0983	0.8568	1.8267	0.9700
	12,5ng	1:100	0.5207	0.0340	0.6228	1.8494	1.2266
		1:200	0.5634	0.0662	0.7620	1.7754	1.0134
*1:40.000	50ng	1:100	0.2367	0.1779	0.7705	1.1684	0.3978
		1:200	0.1972	0.1035	0.5077	1.0357	0.5280
	*25ng	*1:100	0.1999	0.0940	0.4818	1.1213	0.6395
		1:200	0.1904	0.0645	0.3839	0.9630	0.5791
	12,5ng	1:100	0.1873	0.0394	0.3056	0.9994	0.6938
		1:200	0.2026	0.0343	0.3053	0.9059	0.6006
1:80.000	50ng	1:100	0.1830	0.1040	0.4949	0.8566	0.3617
		1:200	0.1715	0.0561	0.3397	0.7252	0.3856
	25ng	1:100	0.1665	0.0446	0.3003	0.7409	0.4406
		1:200	0.1428	0.0212	0.2064	0.6484	0.4420
	12,5ng	1:100	0.0281	0.0281	0.1122	0.7089	0.5967
		1:200	0.0183	0.0183	0.0732	0.6501	0.5769

Fonte: O autor.

Nota: A linha em negrito representa as condições onde houve o resultado melhor caracterizado (*).

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

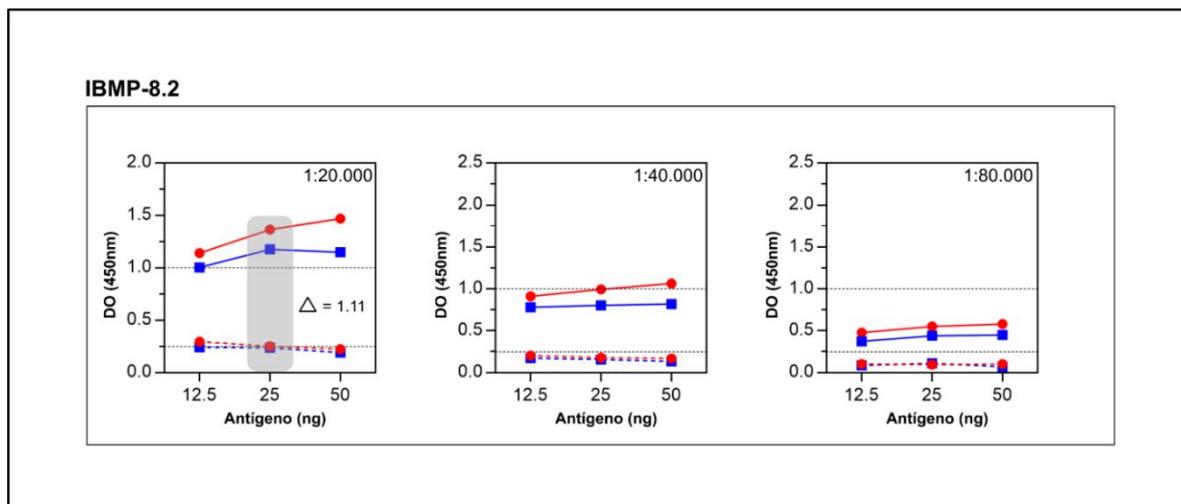


Figura 14 - Análise gráfica dos valores médios de absorvância do antígeno IBMP 8.2.

Fonte: O autor.

Nota: Análise gráfica dos valores médios de absorvância do antígeno IBMP 8.2, variando a diluição sérica de 100 e 200 vezes e a diluição do conjugado de 20.000, 40.000 e 80.000 vezes, com 50, 25 e 12,5 ng do antígeno. As linhas tracejadas inferiores representam o limite máximo requerido para o conjunto de amostras negativas (0.250). As linhas tracejadas superiores representam o limite mínimo desejável de densidade ótica para as amostras positivas (1.000). As linhas vermelhas correspondem à uma diluição de 1:100. As linhas azuis correspondem à uma diluição de 1:200. As linhas vermelhas e azuis contínuas representam os sinais das amostras positivas. As linhas vermelhas e azuis tracejadas representam as amostras negativas. Os pontos vermelhos, simbolizados com círculos “●” representam os valores médios obtidos para amostras na diluição 1:100. Os pontos azuis, simbolizados com quadrados “■” representam os valores médios obtidos para amostras na diluição 1:200.

Legenda: DO (densidade ótica); ng (nanograma).

Tabela 2 - Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao antígeno IBMP-8.2.

Conjugado	Antígeno	Soro	\bar{X} NEG	DP	\bar{X} NEG+3DP	\bar{X} POS	$(\bar{X}POS) - (\bar{X}NEG+3DP)$
*1:20.000	50ng	1:100	0.2239	0.0539	0.3857	1.4686	1.0830
		1:200	0.1924	0.0414	0.3166	1.1476	0.8310
	*25ng	*1:100	0.2545	0.0472	0.3962	1.3650	0.9688
		1:200	0.2373	0.0459	0.3749	1.1777	0.8028
	12,5ng	1:100	0.2974	0.0206	0.3592	1.1401	0.7809
		1:200	0.2440	0.0480	0.3880	1.0033	0.6153
1:40.000	50ng	1:100	0.1697	0.0301	0.2600	1.0647	0.8048
		1:200	0.1346	0.0247	0.2085	0.8182	0.6097
	25ng	1:100	0.1808	0.0273	0.2626	0.9940	0.7314
		1:200	0.1594	0.0358	0.2667	0.8039	0.5373
	12,5ng	1:100	0.2049	0.0218	0.2704	0.9102	0.6398
		1:200	0.1720	0.0326	0.2699	0.7810	0.5111
1:80.000	50ng	1:100	0.1026	0.0199	0.1623	0.5818	0.4195
		1:200	0.0726	0.0123	0.1097	0.4496	0.3399
	25ng	1:100	0.0972	0.0184	0.1525	0.5523	0.3999
		1:200	0.1125	0.0565	0.2821	0.4412	0.1591
	12,5ng	1:100	0.0160	0.0160	0.0640	0.4801	0.4161
		1:200	0.0294	0.0294	0.1177	0.3727	0.2550

Fonte: O autor.

Nota: A linha em negrito representa as condições onde houve o resultado melhor caracterizado (*).

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

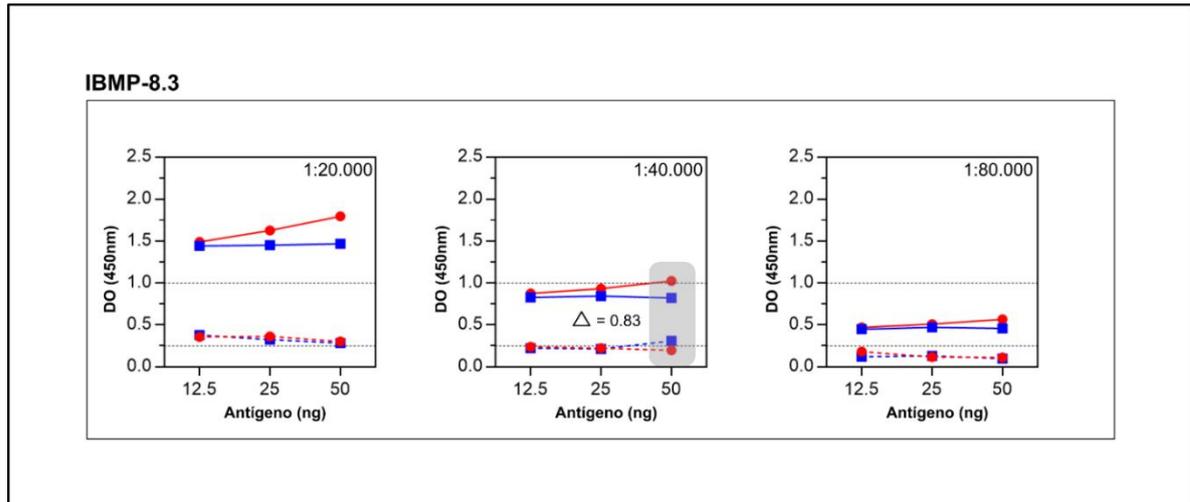


Figura 15 - Análise gráfica dos valores médios de absorvância do antígeno IBMP 8.3.

Fonte: O autor.

Nota: Análise gráfica dos valores médios de absorvância do antígeno IBMP 8.3, variando a diluição sérica de 100 e 200 vezes e a diluição do conjugado de 20.000, 40.000 e 80.000 vezes, com 50, 25 e 12,5 ng do antígeno. As linhas tracejadas inferiores representam o limite máximo requerido para o conjunto de amostras negativas (0.250). As linhas tracejadas superiores representam o limite mínimo desejável de densidade ótica para as amostras positivas (1.000). As linhas vermelhas correspondem à uma diluição de 1:100. As linhas azuis correspondem à uma diluição de 1:200. As linhas vermelhas e azuis contínuas representam os sinais das amostras positivas. As linhas vermelhas e azuis tracejadas representam as amostras negativas. Os pontos vermelhos, simbolizados com círculos “●” representam os valores médios obtidos para amostras na diluição 1:100. Os pontos azuis, simbolizados com quadrados “■” representam os valores médios obtidos para amostras na diluição 1:200.

Legenda: DO (densidade ótica); ng (nanograma).

Tabela 3 - Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao antígeno IBMP-8.3

Conjugado	Antígeno	Soro	\bar{X} NEG	DP	\bar{X} NEG+3DP	\bar{X} POS	$(\bar{X}POS)-(\bar{X}NEG+3DP)$
1:20.000	50ng	1:100	0.3028	0.0418	0.4283	1.7958	1.3675
		1:200	0.2865	0.0711	0.4999	1.4667	0.9668
	25ng	1:100	0.3649	0.0667	0.5650	1.6266	1.0616
		1:200	0.3247	0.0770	0.5557	1.4531	0.8974
	12,5ng	1:100	0.3569	0.0458	0.4943	1.4906	0.9963
		1:200	0.3798	0.0861	0.6381	1.4442	0.8060
*1:40.000	*50ng	*1:100	0.2003	0.0239	0.2719	1.0246	0.7527
		1:200	0.2110	0.0280	0.2950	0.8232	0.5560
	25ng	1:100	0.2244	0.0237	0.2955	0.9340	0.6385
		1:200	0.2155	0.0462	0.3541	0.8440	0.4899
	12,5ng	1:100	0.2407	0.0284	0.3258	0.8756	0.5498
		1:200	0.2244	0.0450	0.3594	0.8277	0.4683
1:80.000	50ng	1:100	0.1115	0.0183	0.1664	0.5689	0.4024
		1:200	0.1009	0.0248	0.1754	0.4605	0.2851
	25ng	1:100	0.1179	0.0189	0.1747	0.5090	0.3343
		1:200	0.1314	0.0060	0.1493	0.4709	0.3216
	12,5ng	1:100	0.0689	0.0689	0.2755	0.4710	0.1956
		1:200	0.0221	0.0221	0.0883	0.4515	0.3631

Fonte: O autor.

Nota: A linha em negrito representa as condições onde houve o resultado melhor caracterizado (*).

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

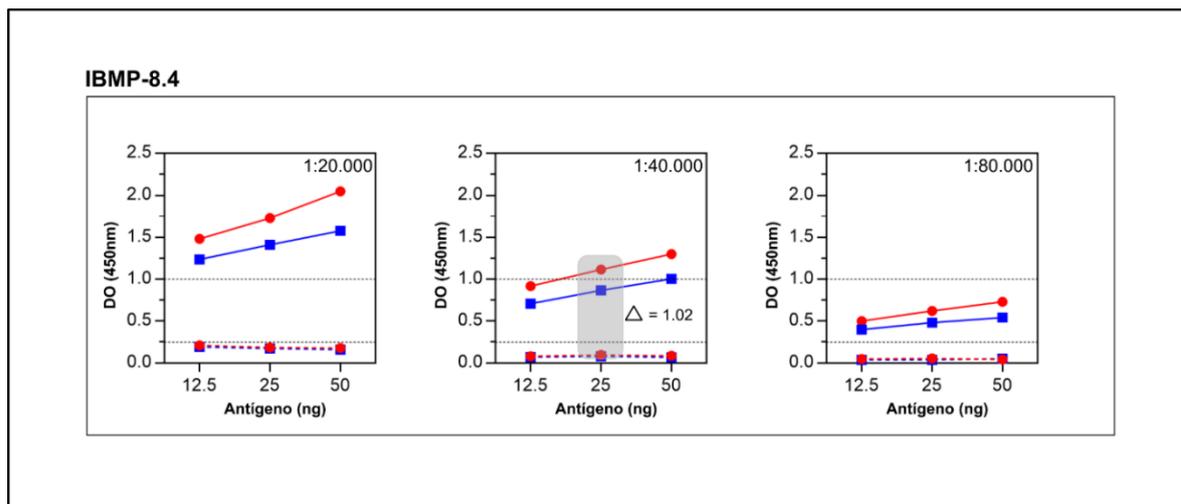


Figura 16 - Análise gráfica dos valores médios de absorvância do antígeno IBMP 8.4.

Fonte: O autor.

Nota: Análise gráfica dos valores médios de absorvância do antígeno IBMP 8.4, variando a diluição sérica de 100 e 200 vezes e a diluição do conjugado de 20.000, 40.000 e 80.000 vezes, com 50, 25 e 12,5 ng do antígeno. As linhas tracejadas inferiores representam o limite máximo requerido para o conjunto de amostras negativas (0.250). As linhas tracejadas superiores representam o limite mínimo desejável de densidade ótica para as amostras positivas (1.000). As linhas vermelhas correspondem à uma diluição de 1:100. As linhas azuis correspondem à uma diluição de 1:200. As linhas vermelhas e azuis contínuas representam os sinais das amostras positivas. As linhas vermelhas e azuis tracejadas representam as amostras negativas. Os pontos vermelhos, simbolizados com círculos “●” representam os valores médios obtidos para amostras na diluição 1:100. Os pontos azuis, simbolizados com quadrados “■” representam os valores médios obtidos para amostras na diluição 1:200.

Legenda: DO (densidade ótica); ng (nanograma).

Tabela 4 - Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao antígeno IBMP-8.4.

Conjugado	Antígeno	Soro	\bar{X} NEG	DP	\bar{X} NEG+3DP	\bar{X} POS	$(\bar{X} POS)-(\bar{X} NEG+3DP)$
1:20.000	50ng	1:100	0.1797	0.0268	0.2601	2.0467	1.7866
		1:200	0.1602	0.0240	0.2322	1.5757	1.3434
	25ng	1:100	0.1858	0.0338	0.2871	1.7286	1.4415
		1:200	0.1723	0.0209	0.2349	1.4099	1.1750
	12,5ng	1:100	0.2099	0.0566	0.3796	1.4800	1.1004
		1:200	0.1919	0.0277	0.2748	1.2359	0.9611
*1:40.000	50ng	1:100	0.0857	0.0206	0.1475	1.2977	1.1501
		1:200	0.0681	0.0166	0.1179	1.0041	0.8862
	*25ng	*1:100	0.0962	0.0264	0.1754	1.1144	0.9390
		1:200	0.0814	0.0106	0.1132	0.8662	0.7530
	12,5ng	1:100	0.0819	0.0221	0.1480	0.9189	0.7708
		1:200	0.0709	0.0088	0.0972	0.7065	0.6093
1:80.000	50ng	1:100	0.0436	0.0095	0.0722	0.7301	0.6579
		1:200	0.0531	0.0070	0.0739	0.5414	0.4675
	25ng	1:100	0.0551	0.0190	0.1122	0.6233	0.5112
		1:200	0.0388	0.0075	0.0612	0.4806	0.4194
	12,5ng	1:100	0.0116	0.0116	0.0463	0.5020	0.4557
		1:200	0.0059	0.0059	0.0237	0.3986	0.3749

Fonte: O autor.

Nota: A linha em negrito representa as condições onde houve o resultado melhor caracterizado (*).

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

5.4 ESTUDO DE FASE I

O estudo da fase I foi realizado utilizando dois painéis sorológicos distintos. O painel 1 foi composto por soros de cães experimentalmente infectados por *T. cruzi* com cepas conhecidas, enquanto o grupo 2 foi composto por amostras provenientes de pesquisas de campo, de cães naturalmente infectados pelo parasita, sem informações disponíveis sobre as cepas infectantes. A análise combinada foi realizada avaliando as amostras dos painéis 1 e 2. Com base nos valores da AUC (Figura 17), os antígenos quiméricos IBMP foram classificados com potencial de diagnóstico entre excelente (100%) para a IBMP-8.4 e elevado (98,4%-99,9%) para os demais antígenos, independentemente do painel sorológico avaliado. Com base na AUC do painel combinado, o antígeno com a maior capacidade discriminatória foi o IBMP-8.4 (AUC = 100%), seguido da 8.3 (AUC = 99,7%), 8.2 (AUC = 94,9%) e do IBMP-8.1 (AUC = 91,2%). Os valores de AUC encontrados para as moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4 foram estatisticamente superiores aos obtidos para as demais moléculas. Analisando as amostras positivas para *T. cruzi*, o IBMP-8.3 apresentou o maior valor de IR na análise combinada. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o IR das moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4, considerando a sobreposição dos valores do IC95%. O menor valor médio do IR foi observado nos ensaios com o antígeno IBMP-8.1, no entanto, considerando apenas o painel 2, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os IR do IBMP-8.1 e IBMP-8.2 ou IBMP-8.3. Com relação às amostras negativas para *T. cruzi*, os valores do IR encontraram-se abaixo de 0,45 para todos os quatro antígenos quiméricos avaliados, independente do painel investigado. O antígeno IBMP-8.3 apresentou sensibilidade de 100% em todos os painéis avaliados, seguido pelo IBMP-8.4 (96,7% - 100%), IBMP-8.2 (73,3% - 87,5%) e IBMP-8.1 (50% - 100%). Considerando a análise combinada dos dois painéis, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes da sensibilidade para as proteínas quiméricas IBMP-8.3 e IBMP-8.4. Os valores de especificidade de todos os antígenos ultrapassaram 89%, sendo que para os antígenos IBMP-8.2 e IBMP-8.4 os valores foram de 100% independentemente do painel avaliado.

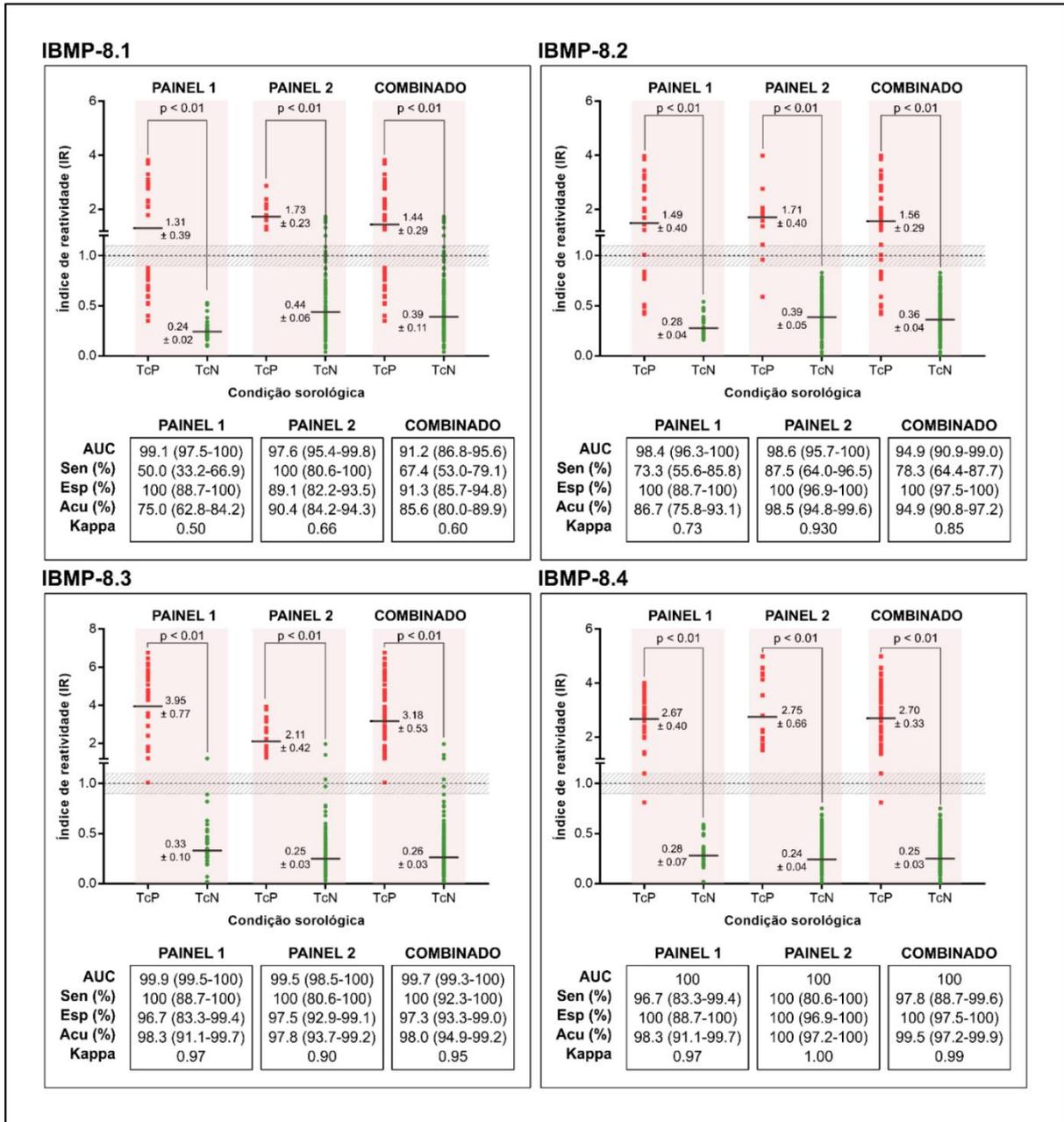


Figura 17 - Índices de reatividade e parâmetros de desempenho diagnóstico obtidos com amostras de soro de cães infectados e não infectados pelo *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: O autor.

Nota: Painel 1 (cães infectados experimentalmente com as cepas Y (DTU TcII), Berenice (DTU TcII) e Colombiana (DTU TcI)); Painel 2 (cães naturalmente infectados com cepas desconhecidas). As zonas sombreadas representam as faixas de resultados inconclusivos ($IR = 1.0 \pm 0.10$); Linhas horizontais e números para cada grupo de resultados representam as médias geométricas (\pm IC95%).

Legenda: TcP (amostras positivas para anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*); TcN (amostras negativas para anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*); AUC (área da curva ROC); IR (índice de reatividade); Sen (sensibilidade); Esp (especificidade); Acu (acurácia); Kappa (índice Kappa de Cohen).

Resultados falso-negativos produzidos pelo antígeno IBMP-8.1 ocorrem nas amostras de seis cães infectados da cepa colombiana (6/12), seis com a cepa Y (6/8) e três com a cepa Berenice (3/10), cuja coleta de soros ocorreu em 2 meses (nove animais) (9/9), seis meses (três

animais) (3/11) e quinze meses (três animais) (3/10) pós-infecção (Figura 17). O antígeno IBMP-8.2 também produziu alto número de resultados falso-negativos, devido a sete cães infectados com a cepa Colombiana (7/12) e um com a cepa Y (1/8). A coleta destes animais ocorreu 2 meses (três animais) (3/9), seis meses (dois animais) (2/11) e quinze meses (dois animais) (2/10) pós-infecção. O antígeno IBMP-8.4 apresentou um resultado falso-negativo no painel 1. Esta amostra foi oriunda de um cão experimentalmente infectado com a cepa Y, sendo a coleta foi realizada 6 meses pós-infecção. A avaliação da acurácia dos IBMP-ELISA mostrou valores superiores a 99% para o IBMP-8.4, 98% para o IBMP-8.3 e 94% para o IBMP-8.2, sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Por outro lado, o IBMP-8.1 exibiu 85,6% de acurácia, com diferença estatística em comparação com os demais antígenos.

Adotando a zona cinza (zona de inconclusividade) como $IR = 1,0 \pm 10\%$, observou-se que um pequeno número de amostras foi caracterizado como inconclusivo usando os antígenos IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4. No entanto, os valores de IR de seis (2%) amostras negativas para *T. cruzi* foram qualificados como na zona cinza quando analisadas usando o antígeno IBMP-8.1. Nenhuma amostra negativa para *T. cruzi* avaliada pelos antígenos IBMP-8.2 e IBMP-8.4 apresentou resultados dentro da margem de inconclusividade. Contudo, duas amostras negativas para *T. cruzi* apresentaram resultados inconclusivos quando avaliadas com o antígeno IBMP-8.3. Com relação a amostras positivas para *T. cruzi*, uma delas foi inconclusiva quando analisada com IBMP-8.3 ou com o IBMP-8.4 e mais duas amostras testadas pelo antígeno IBMP-8.2 também apresentaram resultados similares. A análise geral mostrou que 0,33% das amostras usando o IBMP-8.4, 1% usando IBMP-8.2 ou IBMP-8.3 e 2% utilizando o IBMP-8.1 apresentaram valores de IR dentro da margem de inconclusividade.

Visando avaliar a heterogeneidade do reconhecimento dos antígenos frente aos anticorpos anti-*T. cruzi* específicos, estratificamos o painel 1 de acordo com a cepa utilizada na infecção experimental dos cães. Desta forma, os valores de IR e da sensibilidade foram comparados usando amostras de cães infectados com cepas Berenice (n = 10), Colombiana (n = 12) e Y (n = 8). Assim, os maiores valores de IR foram encontrados quando amostras positivas para *T. cruzi* foram testadas usando o antígeno IBMP-8.3, seguido pelo IBMP-8.4. No entanto, os valores de IR para as cepas Berenice e Y foram estatisticamente maiores para o IBMP-8.3 em comparação com o antígeno IBMP-8.4 (Figura 18). Contrariamente, nenhuma diferença estatística foi encontrada quando a cepa Colombiana foi testada com os antígenos IBMP-8.3 e IBMP-8.4. Os valores mais baixos do IR foram encontrados para o antígeno IBMP-8.1. Apenas duas das oito amostras foram corretamente classificadas como positivas para *T.*

cruzi, produzindo um valor médio de IR de 0,9 e sensibilidade de 25%. Valor do IR semelhante foi observado quando amostras da cepa Colombiana foram avaliadas usando o antígeno IBMP-8.2, porém com sensibilidade de 41.7%. Como mostrado na Fig. 17, os maiores valores de sensibilidade foram observados para os antígenos IBMP-8.3 (100%) e IBMP-8.4 (87,5-100%), sem diferença estatística entre eles.

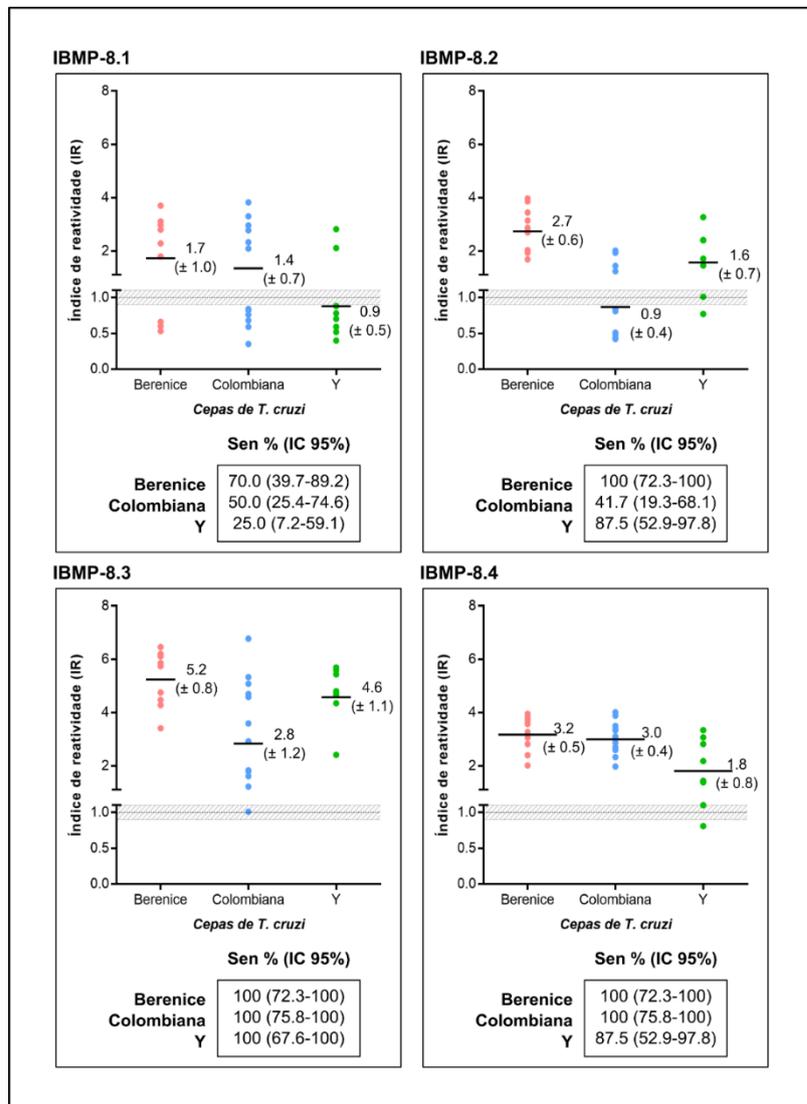


Figura 18 - Índices de reatividade dos antígenos IBMP frente às amostras de 30 cães experimentalmente infectados com diferentes cepas distintas do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: O autor.

Nota: As zonas sombreadas representam as faixas de resultados inconclusivos ($IR = 1.0 \pm 0.10$); Linhas horizontais e números para cada grupo de resultados representam as médias geométricas ($\pm IC95\%$).

Legenda: IC95% (intervalo de confiança de 95%); IR (índice de reatividade); Sen (sensibilidade).

A avaliação da reatividade cruzada foi realizada utilizando um painel de 51 amostras coletadas de animais de campo, naturalmente infectados, caracterizados laboratorialmente para dirofilariose, babesiose, erliquiose, leishmaniose e anaplasnose. Como ilustrado na Figura 19, não foram observadas reações cruzadas utilizando os antígenos IBMP-8.2 e IBMP-8.4. A incidência de reatividade cruzada usando o antígeno IBMP-8.3 não alcançou uma significância estatística; apenas uma amostra positiva para *Leishmania* spp. produziu um resultado falso-positivo. Por outro lado, 13,5% das amostras testadas usando o antígeno IBMP-8.1 apresentaram resultado falso-positivo. De fato, ao menos uma amostra de cada doença infecto-parasitária apresentou reação cruzada para este antígeno, produzindo uma incidência de reação cruzada de 16,7% para anaplasnose, 17,7% para babesiose, 12,5% para dirofilariose e 15,4% para erliquiose. Paradoxalmente, não foi observada a ocorrência de reação cruzada para as amostras positivas *Leishmania* spp. usando o antígeno IBMP-8.1.

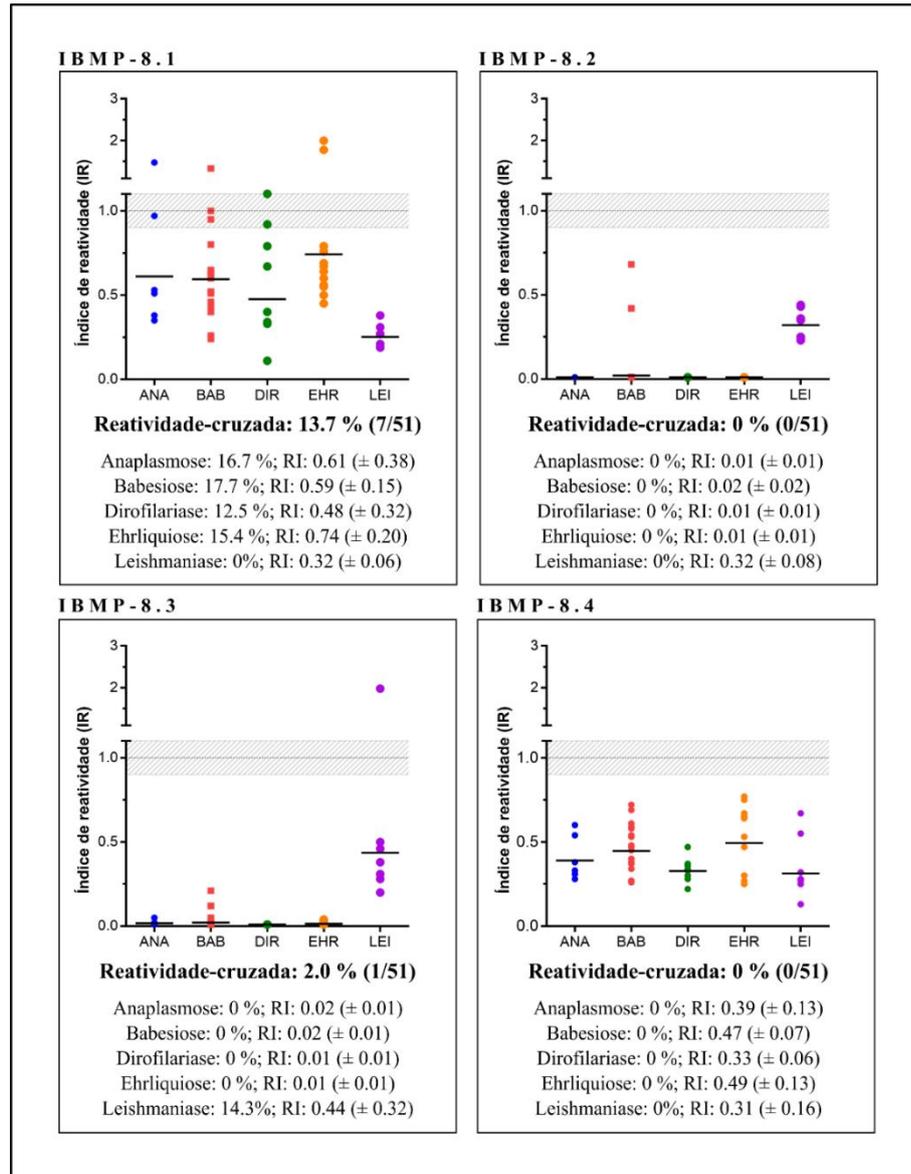


Figura 19 - Análise gráfica da reatividade cruzada das proteínas quiméricas IBMP frente ao soro de cães infectados com outras doenças infecto-parasitárias.

Fonte: O autor.

Nota: As zonas sombreadas representam as faixas de resultados inconclusivos ($IR = 1.0 \pm 0.10$); Linhas horizontais e números para cada grupo de resultados representam as médias geométricas (\pm IC95%).

Legenda: RI (índice de reatividade).

6 DISCUSSÃO

A ausência de testes comercialmente disponíveis para o diagnóstico da doença de Chagas crônica em cães contribui negativamente no manejo desta parasitose. O *Trypanosoma cruzi* possui capacidade de infectar células do músculo cardíaco (TORRES, 1917) e neurônios (CAMPOS, 1925) de cães, por este motivo estes animais são utilizados como modelos experimentais para a DC (TORRES e VILLAÇA, 1919). Este modelo experimental é utilizado extensamente, inclusive foi utilizado no IGM/Fiocruz Bahia em estudos conduzidos pelo Dr. Zilton Andrade (ANDRADE, 1984), porém, até a presente data, nunca houve um teste comercial para o diagnóstico da DC canina. No desenvolvimento de plataformas de imunodiagnóstico para a DC, as principais problemáticas estão na escolha dos antígenos para a detecção de anticorpos específicos e na elevada variação antigênica, derivada da alta variabilidade genética inerente ao *T. cruzi*, a qual está relacionada à sorodiscordância entre imunoenaios (GUZMÁN-GÓMEZ *et al.*, 2015). Para endereçar esta variabilidade, antígenos quiméricos compostos por epítomos conservados de diversas proteínas do *T. cruzi* podem ser empregados em imunoenaios, elevando os parâmetros de desempenho, como especificidade e/ou sensibilidade (SANTOS *et al.*, 2018). No presente estudo, avaliamos o desempenho diagnóstico de quatro antígenos recombinantes quiméricos para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro de cães na fase crônica da DC. Este é o primeiro estudo utilizando proteínas quiméricas recombinantes para diagnosticar DC crônica em cães naturalmente e experimentalmente infectados com cepas conhecidas de *T. cruzi*.

6.1 CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL

Há uma diferença significativa no desempenho diagnóstico de testes comerciais disponíveis para diagnóstico em humanos devido à alta variabilidade genética do *T. cruzi* e as diferentes preparações antigênicas empregadas para capturar anticorpos específicos. Por isto, no Brasil, o Ministério da Saúde recomenda a utilização de dois ensaios sorológicos com preparações antigênicas distintas ou dois testes com princípios metodológicos diferentes para o diagnóstico sorológico da DC em humanos. Nosso grupo determinou o procedimento para a caracterização sorológica da DC em cães seguindo as recomendações do Ministério da Saúde para o diagnóstico da DC em humanos (DIAS *et al.*, 2016), utilizando ao menos dois testes com antígenos distintos para confirmação da condição sorológica de cada animal.

A maioria dos levantamentos sorológicos em cães empregam proteínas nativas do *T. cruzi* como antígeno de captura, o que pode ocasionar dificuldades na padronização, baixa estabilidade, baixa especificidade e reatividade cruzada com outros tripanosomatídeos. De fato, os inquéritos sorológicos baseados em ensaios imunoenzimáticos para DC em cães utilizaram, em sua maioria, métodos *in-house* ou protocolos adaptados de kits comerciais para humanos, como demonstrado no Quadro 1. Além da alta variabilidade genética do *T. cruzi*, há a questão da reatividade cruzada com outros tripanosomatídeos, como *Trypanosoma evansi* (DESQUESNES *et al.*, 2007), *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma caninum* e espécies do gênero *Leishmania* spp. (CABALLERO *et al.*, 2007), que por sua vez é um problema sério no que tange o sorodiagnóstico, dado que muitas vezes existe co-endemicidade do *T. cruzi* com outros parasitas desta família, especialmente com a *Leishmania* spp. (XAVIER *et al.*, 2012). Tal problema ocorre por conta do compartilhamento de genes ortólogos com outros tripanosomatídeos (FIGURA 20), gerando assim, antígenos com epítomos idênticos e/ou similares ao do *T. cruzi* (TSCHOEKE, 2013). Para os testes sorológicos que empregam antígenos nativos, quando utilizados em áreas de co-endemicidade com outros tripanosomatídeos, como a *Leishmania* spp, é possível observar a influência da proximidade filogenética entre os parasitas sobre a especificidade dos ensaios, provendo baixa especificidade e resultados falso-positivos, os quais podem levar a uma falha no tratamento veterinário e/ou fornecer dados epidemiológicos errôneos em estudos de inquéritos sorológicos.

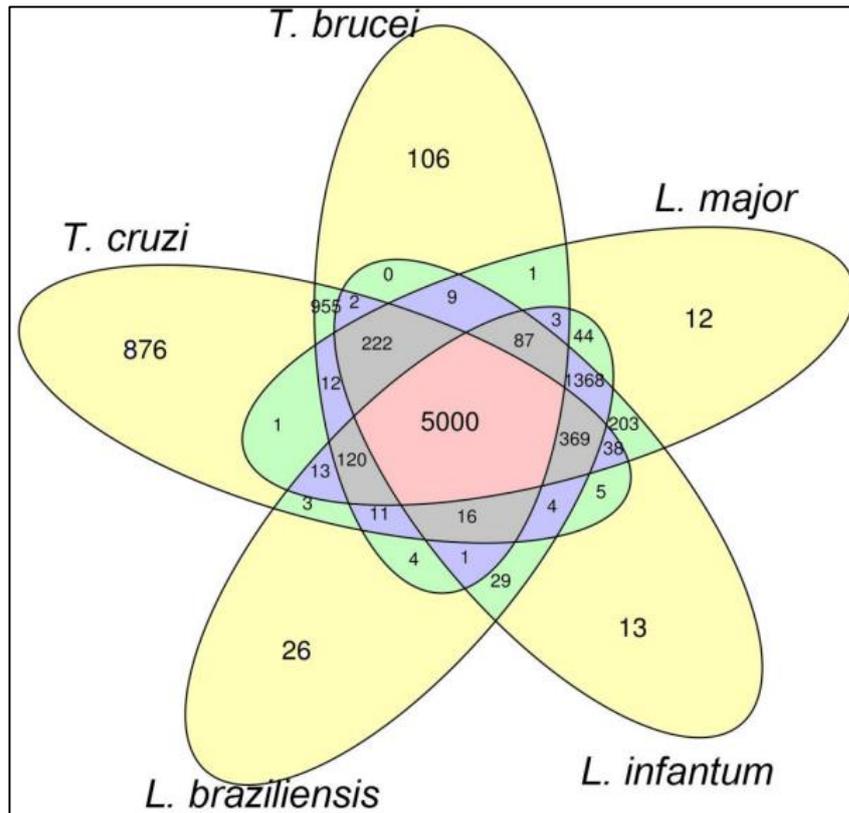


Figura 20 - Diagrama de Venn construído ilustrando o compartilhamento de famílias de genes ortólogos entre cinco espécies de protozoários da classe Kinetoplastida. A figura mostra a distribuição dos grupos ortólogos de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum* e *Leishmania major* inferidos pelo programa computacional OrthoMCL.

Fonte: TSCHOEKE., 2013

Nota: As áreas amarelas (106, 12, 13, 26 e 876) mostram proteínas apenas de uma espécie, verde (0, 1, 44, 203, 5, 29, 4, 3, 1, 955) compartilhada por grupos de duas espécies, a área azul (9,3,1368,38,4,1,11,13,12 e 2) por três espécies e cinza (87,369,16,120 e 222) e vermelha (5000) compartilhada por quatro e cinco espécies, respectivamente

Por se tratar de um estudo de fase I, o número amostral é de conveniência (Santos, 2016). Assim, três painéis amostrais distintos foram obtidos: o painel 1, caracterizado por amostras de cães de canil, experimentalmente infectados ou livres de doenças infecto-parasitárias; o painel 2, composto por amostras de campo, de cães naturalmente infectados por *T. cruzi* ou livres de doenças infecto-parasitárias; e o painel 3, composto por amostras de cães não infectados pelo *T. cruzi*, mas portadores de outras doenças infecto-parasitárias.

As amostras do painel 1 foram oriundas da UFOP, de cães criados em canil, experimentalmente infectados ou livres de doenças infecto-parasitárias. Os animais experimentalmente infectados deste painel apresentaram parasitemia na fase aguda,

evidenciado pela análise microscópica de gota espessa. Estes animais foram infectados com cepas conhecidas, sendo 12 amostras da cepa Colombiana, 8 da cepa Y e 10 da cepa Berenice-78. Além das amostras de cães experimentalmente infectados, obtivemos mais 31 amostras da UFOP de cães saudáveis, não portadores de doenças infecto-parasitárias e criados em canil. As amostras dos cães experimentalmente infectados foram colhidas 2, 6 e 15 meses após a inoculação do parasita, objetivando a coleta desde o início da produção de IgG até a estabilização da sua titulação (GUEDES *et al.*, 2002). Neste painel, houve poucas amostras sorologicamente discordantes. A maior parte da discordância foi a partir de cães infectados com a cepa Y e de amostras colhidas no segundo mês de infecção. Isto pode ser explicado pelas características da infecção canina pela cepa Y, que tende a ter uma menor parasitemia *in vivo* (MARTÍNEZ-DÍAZ *et al.*, 2001) ou pelo fato da cepa Y ser classificada como uma cepa atenuada, por conta de uma menor parasitemia e menor produção de proteínas atribuídas à virulência (PIACENZA *et al.*, 2009).

O painel 2, por sua vez, foi composto por amostras de cães naturalmente infectados com o parasita, coletadas em áreas endêmicas para *T. cruzi* no Rio de Janeiro e na Bahia, da soroteca de Dra. Ana Jansen, do LABTRIP (IOC) e Dra. Déborah Fraga, do IGM, respectivamente. Os painéis foram encaminhadas ao nosso grupo já caracterizados quanto à presença de anticorpos IgG anti- *Leishmania* spp. através de ELISA e IFI. Adicionalmente, realizamos uma recharacterização dos painéis, à fim de identificar a presença de IgG anti-*Leishmania* spp. (DPP[®] LVC Bio-Manguinhos, Brasil) e anti-*T. cruzi* (Gold Elisa Chagas[®] adaptado e ELISA *in house* de lisado da cepa Y do *T. cruzi*). Neste painel, a caracterização sorológica apresentou resultados inesperados, provavelmente por se tratar de animais que possam ter sido infectados com outros tripanosomatídeos, como por exemplo o *T. evansi* (DESQUESNES; BOSSENO; BRENIÈRE, 2007), *T. caninum* ou o *T. rangeli* (DE MORAES *et al.*, 2008), o que pode ter sido responsável pelo alto número de resultados discordantes.

O painel 3, para avaliação de reatividade cruzada, foi cedido da soroteca de Dr. Felipe Dantas-Torres, do Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-Fiocruz/PE). Estas amostras foram oriundas de animais de campo, que exibiam anticorpos IgG reativos à antígenos de outros parasitas causadores de outras doenças infecto-parasitárias caninas de relevância veterinária, como *Leishmania* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Dirofilaria* spp. Poucas amostras foram sorologicamente discordantes na recharacterização, provavelmente por se tratar de animais de campo,

naturalmente infectados com outros patógenos e de regiões co-endêmicas para outros tripanosomatídeos.

6.2 PADRONIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO IBMP-ELISA INDIRETO

A padronização dos componentes do ELISA foi realizada através de uma matriz de decisão (*checkerboard titration*). Assim como observado previamente pelo nosso grupo em humanos, os ensaios exibiram uma alta capacidade de detecção de IgG anti-*T. cruzi* em cães. De fato, o uso de antígenos quiméricos elevou consideravelmente os parâmetros de desempenho dos testes e podem ser mais econômicos, devido ao menor uso de reagentes.

Nos ensaios do nosso grupo, utilizamos de 25 a 50 ng do antígeno por poço, que por sua vez, é uma quantidade significativamente menor do que as utilizadas em outros estudos. Em estudos empregando antígenos nativos, utilizaram-se de 250 ng (ALROY *et al.*, 2015) à 1 mg (LAURICELLA *et al.*, 1998) de antígeno por poço, ou seja, uma quantidade de 10 à 40.000 vezes maior do que no IBMP-ELISA, considerando-se 25 ng por poço. Adicionalmente, o IBMP-ELISA não necessitou de agentes bloqueadores peptídicos, como soro fetal bovino (SFB) (SHADOMY *et al.*, 2004), BSA, leite desnatado (LAURICELLA *et al.*, 1998) ou soro equino (JIMENEZ-COELLO *et al.*, 2008), que apresentam algumas desvantagens, como variação entre lotes (GIBBS, 2001), ligações inespecíficas com proteínas animais (XIAO e ISAACS, 2013) ou rápida deterioração (WILD, 2013). Na etapa de bloqueio das placas do IBMP-ELISA, utilizamos o WellChampion™ (lote 130703; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca). Trata-se de um agente não-peptídico que bloqueia, estabiliza e preserva a fase sólida do teste em uma única etapa, reduzindo o tempo de sensibilização, a quantidade de resíduos e custos de produção. Este agente já foi utilizado com sucesso em estudo prévios (PENG *et al.*, 2014; SANTOS, 2016). Por não se tratar de um produto animal/celular, o mesmo não sofre variações entre lotes, possui longa estabilidade (4 anos quando armazenado entre 2-8°C), além de simplificar e acelerar o processo de sensibilização da placa.

Além de se utilizar uma pequena quantidade de antígenos por poço, os antígenos quiméricos IBMP necessitam de menos anticorpos secundários, um reflexo da maior quantidade de IgGs capturados, o qual é proporcional à oferta de epítomos que os antígenos apresentam. De fato, na literatura, os imunoenaios para DC em cães empregando antígenos nativos, relatam diluições de anticorpo secundário que variaram entre 1:50 (ESTRADA-FRANCO *et al.*, 2006) até 1:2.000 (SALDAÑA *et al.*, 2015), enquanto no IBMP-ELISA

utilizamos diluições entre 1:20.000 e 1:40.000. O fator de diluição do soro em protocolos disponíveis em literatura variaram de 1:25 (SALDAÑA *et al.*, 2015) à 1:200 (LAURICELLA *et al.*, 1998). No IBMP-ELISA, utilizamos a diluição em 1:100, sendo que esta diluição pode ser observada em outros protocolos de imunoenaios para DC em cães e humanos (UMEZAWA *et al.*, 2009; BARBOSA-PLIEGO *et al.*, 2011), porém, diferente dos demais, nosso protocolo não necessita de agentes bloqueadores de ligações inespecíficas nas diluições das amostras, do anticorpo secundário ou do tampão de sensibilização. Além disso, o tempo necessário de sensibilização com os antígenos IBMP foi significativamente menor que aqueles reportados na literatura, os quais relataram, em sua maioria, 18 horas à 4°C (GRANJON *et al.*, 2016; GUZMÁN-GÓMEZ *et al.*, 2015; LAURICELLA *et al.*, 1998; SÁNCHEZ *et al.*, 2001; UMEZAWA *et al.*, 2009), enquanto que a etapa de sensibilização dos nossos ensaios foi de 15 minutos à temperatura ambiente.

6.3 ESTUDO DE FASE I

No estudo de fase I, os ensaios IBMP-ELISA exibiram uma alta capacidade diagnóstica, apresentando valores de AUC superiores a 90% para todos os antígenos, indicando um ótimo poder discriminatório entre a presença ou ausência de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soro canino. Os antígenos quiméricos IBMP-8.3 e IBMP-8.4 foram os que apresentaram o maior poder discriminatório, uma vez que apresentaram valores de AUC de 99,7% e 100%, respectivamente. De fato, o antígeno IBMP-8.3 diagnosticou corretamente todas as amostras positivas para *T. cruzi*, independentemente do painel ou cepa, enquanto o antígeno IBMP-8.4 identificou erroneamente apenas uma amostra positiva de cão infectado com a cepa Y como negativa, sendo que a coleta de material desta amostra ocorreu no segundo mês após a infecção experimental. Por outro lado, o IBMP-8.1 e IBMP-8.2 apresentaram os menores valores de sensibilidade no painel 1, provavelmente devido à composição peptídica destes antígenos, diferenças físico-químicas entre as imunoglobulinas caninas e humanas, a existência de auto-anticorpos caninos com parátomos complementares aos epítomos destes antígenos e/ou o curto período entre a inoculação e a amostragem. O desempenho geral dos antígenos IBMP-8.3 e -8.4 foram semelhantes àqueles obtidos pelo nosso grupo quando os antígenos IBMP foram avaliados para diagnosticar a DC em humanos (SANTOS *et al.*, 2016a; 2016b; 2017; 2018). Observamos que a maioria dos resultados falso-negativos obtidos pelo uso do IBMP-8.1 e IBMP-8.2 foi associada às amostras do painel 1. Este painel foi composto por cães submetidos a protocolos de infecção bem estabelecidos, nos quais cepas conhecidas do parasita foram

utilizadas. Observamos que quase 50% dos resultados falso-negativos ocorreram em animais cujas amostras foram coletadas dois meses após a infecção. Assim, a quantidade de IgG anti-*T. cruzi* pode não estar presente em níveis suficientes para serem detectados pelos antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.2, visto que o repertório de epítomos destas moléculas, em comparação aos antígenos IBMP-8.3 e o IBMP-8.4, poderia não ser suficientemente diverso para identificar pequenas quantidades de anticorpos circulantes.

A monotonia de epítomos, como a observada em antígenos recombinantes totais, impacta negativamente na capacidade diagnóstica de um antígeno. Um estudo comparativo sobre imunoenaios para o diagnóstico da DC em cães e humanos obteve os valores de AUC de 93% e 97% para o antígeno recombinante rTSSA II e antígenos nativos do *T. cruzi*, respectivamente (CIMINO *et al.*, 2011). Apesar de elevados, tais valores foram inferiores aos encontrados pelo nosso grupo para as moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4. Neste mesmo estudo, os autores observaram valores mais elevados de sensibilidade nos antígenos nativos (96,15%) quando comparados ao rTSSA II (92,86%). Este fato é devido, provavelmente, à natureza do antígeno rTSSA II recombinante, o qual é transcrito por um gene altamente polimórfico entre as linhagens do parasita. Além disso, este antígeno foi obtido a partir da cepa TcII, levando a resultados falso-negativos quando amostras de animais infectados pelas linhagens TcIII e TcVI foram analisadas. Interessantemente, nenhum dos animais infectados com parasitas da linhagem TcI foi identificado como positivo (CIMINO *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, avaliamos o desempenho diagnóstico utilizando amostras de cães experimentalmente infectados com as DTUs TcI (Colombiana) e TcII (Y e Berenice) e obtivemos valores de AUC superiores a 99% para as IBMP-8.3 e -8.4. De fato, a eficiência diagnóstica dos antígenos IBMP -8.1 e -8.4 foi recentemente observado pelo nosso grupo (DOPICO *et al.*, 2019). Neste estudo, os antígenos apresentaram um elevado poder diagnóstico, evidenciado pela elevada AUC, variando entre 0,9998 para o IBMP-8.4 e 1,000 para o IBMP-8.1. É importante levar em consideração que a maioria das amostras DC-positivas foram coletadas de imigrantes bolivianos, sendo que a DTU TcV é a mais comum encontrada na Bolívia (ZINGALES, 2018) e predomina em imigrantes bolivianos que vivem em Barcelona (ABRAS *et al.*, 2017.)

Assim, para que a capacidade diagnóstica de um imunoenensaio seja elevada, deve-se ofertar uma maior quantidade de epítomos imunodominantes durante a reação imunoenzimática. Portanto, é possível afirmar que o alto desempenho dos antígenos quiméricos IBMP foi devido à uma maior oferta e variedade de epítomos específicos em uma única molécula. Embora exista

uma carência na literatura sobre análises da aplicabilidade de antígenos recombinantes quiméricos em cães para o diagnóstico da DC, há relatos sobre a melhora do desempenho de imunoenaios empregando antígenos recombinantes para outras doenças parasitárias (GUIMARÃES-PEIXOTO *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2006).

Apesar dos altos parâmetros de desempenho encontrados nos ensaios IBMP-ELISA, foram observadas variações entre os resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo, quando as moléculas foram avaliadas amostras humanas (SANTOS *et al.*, 2016a; 2016b; 2017). Nos ensaios empregando amostras de cães, o desempenho do antígeno IBMP-8.4 foi similar aquele observado previamente em humanos, sendo seus parâmetros de desempenho superiores aos das outras moléculas. Contraditoriamente, o antígeno IBMP-8.1 foi o de menor desempenho diagnóstico em cães, apresentando baixos valores de sensibilidade (67,4%) e especificidade (91,3%), principalmente para amostras positivas para *T. cruzi* do painel 1, o que não era esperado, já que esta molécula apresentou elevado potencial diagnóstico nas avaliações em humanos (97,4% de sensibilidade e 99,4% de especificidade) (SANTOS *et al.*, 2017). Esta variação pode ser decorrente das diferenças na composição físico-química entre as regiões hipervariáveis dos anticorpos humanos e caninos (STEINIGER *et al.*, 2014) ou então pelo fato do IBMP-8.1 ser um antígeno mais simples, de menor peso e com uma menor variedade de epítomos.

A utilização de misturas antigênicas é uma estratégia usada em ensaios imunológicos para aumentar o repertório de epítomos disponíveis em um ensaio (CAMUSSONE *et al.*, 2009). No entanto, esta estratégia foi previamente estudada pelo nosso grupo utilizando os antígenos quiméricos IBMP e forneceu resultados desanimadores para o diagnóstico da DC em humanos (SANTOS *et al.*, 2017a), reduzindo os valores de sensibilidade e aumentando o índice de reatividade para amostras negativas. Embora os resultados para humanos tenham sido desanimadores, é possível que amostras de cães se comportem diferentemente frente às misturas equimolares usando os antígenos IBMP.

A principal limitação do estudo de fase I consistiu na ausência de um teste de referência para a recharacterização do painel sorológico, visto que não há testes comerciais para esta finalidade. Por este motivo, o teste de referência foi baseado na concordância dos resultados obtidos de um ELISA *in-house* e nos resultados de um teste comercialmente disponível para diagnóstico da DC em humano adaptado. Assim, o desempenho diagnóstico dos antígenos quiméricos IBMP pode ter sido influenciado por conta de falhas na precisão dos testes usados como padrão-ouro. Outra limitação foi o baixo número de amostras de doenças não

relacionadas, porém, esta análise foi uma adição, considerando que a reatividade cruzada é uma matéria de estudos de fase II.

6.4 REATIVIDADE CRUZADA

Considerando a avaliação de reatividade cruzada das amostras caninas com doenças não relacionadas, observou-se um pequeno número de amostras que reagiram de forma cruzada com o antígeno IBMP-8.1, porém, tal ocorrência não foi estatisticamente significativa quando utilizamos os antígenos quiméricos IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4. Notoriamente, em virtude da proximidade filogenética entre o *T. cruzi* com outros tripanosomatídeos, como espécies do gênero *Leishmania* spp., reações cruzadas nos imunoenaios tendem a ocorrer frequentemente (CABALLERO *et al.*, 2007; DESQUESNES *et al.*; ZANETTE *et al.*, 2014; ZINGALES, 2018). No presente estudo, das 9 amostras positivas para *Leishmania* spp. testadas frente aos quatro antígenos, observamos uma reatividade cruzada frente ao antígeno IBMP-8.3. Não esperávamos observar nenhuma reação cruzada, tendo em vista que em estudos prévios do nosso grupo, analisamos as ocorrências de reações cruzadas em um painel de 1.079 amostras de soro humano sororeagentes para outras patologias de interesse médico, como dengue, hepatites B e C, HIV, HTLV, leishmaniose visceral e americana cutânea, leptospirose, rubéola, sarampo, esquistossomose e sífilis, frente aos antígenos IBMP, sendo que neste painel 1.079 amostras, 153 amostras eram positivas para *Leishmania* spp. (SANTOS, 2017) e apenas uma amostra positiva para *Leishmania* spp. foi erroneamente caracterizada como reagente para *T. cruzi*. Neste mesmo estudo, o IBMP-8.4 apresentou o menor número total de reações cruzadas (4/1.079), seguido pela molécula 8.3 (5/1.079), 8.1 (6/1.079) e 8.2 (8/1.079). Não foi observada reatividade cruzada em amostras positivas para *Leishmania* spp. utilizando os antígenos IBMP-8.1, -8.2 e -8.4. Surpreendentemente, em cães, o IBMP-8.1 reconheceu pelo menos um soro para anaplasmose, babesiose, dirofilariose e erliquiose como amostras positivas para *T. cruzi*, produzindo uma taxa de reação cruzada geral de 13,7%. Isso não era esperado devido à baixa similaridade das sequências peptídicas do IBMP-8.1 com as depositadas no banco de dados de proteínas do NCBI para outras espécies. Adicionalmente, amostras com reação cruzada também apresentaram baixo valor de IR. Não foram observados resultados inconclusivos neste painel de reatividade cruzada, exceto para o IBMP-8.1. O desempenho das moléculas IBMP-8.2, 8.3 e 8.4 frente às amostras de outras patologias foi semelhante aos resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo, quando avaliamos a reatividade cruzada em amostras humanas para patógenos de interesse médico usando ELISA e microarranjo líquido (SANTOS *et al.*, 2017a,

2017b). O baixo número de reações cruzadas sugere que os antígenos IBMP, especialmente IBMP-8.3 e IBMP-8.4, podem ser usados com segurança para diagnosticar DC canino em áreas de co-endemicidade com outras doenças infecciosas.

7 CONCLUSÃO

- Os antígenos recombinantes quiméricos IBMP-8.1, -8.2, -8.3 e -8.4 apresentaram uma alta capacidade em diagnosticar a DC crônica em cães naturalmente infectados;
- Os antígenos IBMP-8.3 e -8.4 apresentaram a maior capacidade diagnóstica em animais experimentalmente infectados;
- Os antígenos recombinantes quiméricos IBMP-8.2 e -8.4 obtiveram 100% de especificidade nos painéis 1 e 2;
- O antígeno quimérico IBMP-8.3 obteve 100% de sensibilidade nos painéis 1 e 2;
- O antígeno quimérico IBMP-8.3 foi capaz de diagnosticar corretamente todas as amostras de cães experimentalmente infectados com diferentes cepas distintas do *Trypanosoma cruzi*;
- Não foram observadas reações cruzadas com os antígenos IBMP-8.4 e -8.2.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliação dos antígenos IBMP em plataforma de imunocromatografia;
- Avaliação do desempenho dos antígenos IBMP em misturas equimolares;
- Realização do estudo de Fase II;
- Avaliação da reprodutibilidade intra-teste, inter-teste, inter-laboratório, inter-operadores;
- Avaliação da estabilidade dos antígenos sensibilizados por um período de 48 meses;
- Realização da análise de classe latente.

REFERÊNCIAS

- ABRAS, A. *et al.* Identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain). **Parasitology International**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 83-88, apr. 2017
- ACHA, P.; SZYFRES, B. Zoonosis parasitarias. In: ACHA, P.; SZYFRES, B. (Org.). **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3^{ed}. Washington: Organización Pan-Americana de Saúde, 2003. p. 374-382.
- ALARCÓN DE NOYA, B. *et al.* Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 201, n. 9, p. 1308–1315, 2010.
- ALMEIDA, C. E. *et al.* Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 410-417, dec. 2009.
- ALMEIDA, A. B. *et al.* Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in one dog in Central Western Brazil: a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 4, p. 287-289, jul. 2013.
- ALROY, K. A. *et al.* Prevalence and transmission of *Trypanosoma cruzi* in people of rural communities of the High Jungle of Northern Peru. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e0003779, may. 2015.
- ANDRADE, Z. A. The canine model of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, supl. 0, p. 77-83, 1984.
- ANDRADE, Z. A. *et al.* Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 144, n. 6, p. 1403-1411, jun. 1994.
- ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, supl. 1, p. 71-80, set. 1999.
- ARAUJO, 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.
- ARGOLO, A. M. *et al.* **A Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil**. 1^{ed}. Rio de Janeiro: Programa Integrado de Doença de Chagas, 2008. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/wp-content/uploads/2017/08/09-Doen%C3%A7a-de-Chagas-e-seus-principais-vetores-no-Brasil.pdf>.
- BALAN, L. U. *et al.* Higher seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs than in humans in an urban area of Campeche, Mexico. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 11, n. 7, p. 843-844, jul. 2011.

BANOO, S. *et al.* Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, suppl. 9, p. S21-S31, sept. 2006.

BARBOSA-PLIEGO, A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Circulating in the Southern Region of the State of Mexico (Zumpahuacan) Are Pathogenic: A Dog Model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 3, p. 390–395, 1 set. 2009.

BARBOSA-PLIEGO, A. *et al.* Prevalence of *Trypanosoma cruzi* in dogs (*Canis familiaris*) and *Triatomines* during 2008 in a sanitary region of the State of Mexico, Mexico. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 11, n. 2, p. 151-156, feb. 2011.

BEALL, M. J. *et al.* Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* Species in dogs from Minnesota. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 8, n. 4, p. 455-464, aug. 2008.

BEZERRA, C. M. *et al.* Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Caatinga area colonised by *Triatoma brasiliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 7, p. 887-898, ago. 2014.

BRASIL, P. E. *et al.* ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 10, n. 1, p. 337, nov. 2010.

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.

BROWNE, A. J. *et al.* Corrigendum: The contemporary distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in humans, alternative hosts and vectors. **Scientific Data**, London, v. 4, p. 170071, 30 may 2017.

CABALLERO, Z. C. *et al.* Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, n. 8, p. 1045-1049, may 2007.

CAMPOS-VALDÉZ, G. *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in dogs (*Canis familiaris*) from Tlalnepantla municipality, State of Mexico. **Bioquímica**, Ciudad do México, v. 26, n. 1, p. 16-19, ene./mar. 2001.

CAMPOS, E. S. Sur la paralysie des animaux (chien, souris) infectés expérimentalement avec les cultures de *Trypanosoma cruzi*. **Compte rendu de la Société de Biologie**, Paris, v. 93, n. 20, p. 40-42, 1925.

CAMUSSONE, C. *et al.* Comparison of Recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. **Clinical And Vaccine Immunology**, Boston, v. 16, n. 6, p.899-905, 1 apr. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00005-09>.

CARVALHO-COSTA, F. A. *et al.* Sylvatic and peridomestic populations of *Triatoma pseudomaculata* are not significantly structured by habitat, as revealed by two genetic markers. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 35, n. 2, p. 295-300, dec. 2010.

CASTILLO-NEYRA, R. *et al.* The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 120, n. 3/4, p. 349-356, jul. 2015.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, ago. 1909.

CIMINO, R. O. *et al.* Immuno-enzymatic evaluation of the recombinant TSSA-II protein of *Trypanosoma cruzi* in dogs and human sera: a tool for epidemiological studies. **Parasitology**, London, v. 138, n. 8, p. 995-1002, July 2011.

COFFIELD, D. J. *et al.* A model for Chagas disease with oral and congenital transmission. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e67267, June 2013.

CORTEZ, M. R.; MONTEIRO, F. A.; NOIREAU, F. New insights on the spread of *Triatoma infestans* from Bolivia - implications for Chagas disease emergence in the Southern Cone. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 350-353, Mar. 2010.

CRISANTE, G. *et al.* Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. **Acta tropica**, Basel, v. 98, n. 3, p. 247-254, July 2006.

CURTIS-ROBLES, R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* (agent of Chagas disease) in sympatric human and dog populations in "colonias" of the Lower Rio Grande Valley of Texas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 96, n. 4, p. 805-814, Apr. 2017.

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**, p. JCM.00762-19, 12 Jun. 2019.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* *Leishmania*-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 31, p. 65-69, Feb. 2017.

DE MORAES, M. H. *et al.* Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasites & Vectors**, London, v. 1, n. 1, p. 20, July 2008.

DEL-REI, R. P. ; LEONY, L. M. *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, 18 Apr. 2019.

DESQUESNES, M.; BOSSENO, M.-F.; BRENIÈRE, S. F. Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 457-462, July 2007.

DIAS-LIMA, A. G.; SHERLOCK, I. A. Sylvatic vectors invading houses and the risk of emergence of cases of Chagas disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 5, p. 611-613, out. 2000.

DIAS, J. C. *et al.* 2nd Brazilian Consensus on Chagas disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 49, supl. 1, p. 3-60, dez. 2016.

DIAS, J. P. *et al.* Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 3, p. 296-300, maio/jun. 2008.

DIAS, J.; SCHOFIELD, C. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, supl. 1, p. 103-121, set. 1999.

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.

DUSCHAK, V.; COUTO, A. Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 16, n. 24, p. 3174-3202, 2009.

EDITH, G. *et al.* Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania* spp. by domestic dogs and wild mammals in a rural settlement in Brazil-Bolivian border. **International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 398-404, sept. 2018.

ELOY, L. J.; LUCHEIS, S. B. Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implications for public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 15, n. 4, p. 589-611, nov. 2009.

ENRIQUEZ, G. F. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 211-217, jun. 2013.

ENRIQUEZ, G. F. *et al.* High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 25, p. 36-43, Jul. 2014.

ESTRADA-FRANCO, J. G. *et al.* Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 4, p. 624-630, Apr. 2006.

FERNANDES, A. J. *et al.* The threat of reintroduction of natural transmission of Chagas' disease in Bambuí, Minas Gerais State, Brazil, due to *Panstrongylus megistus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 2, p. 285-289, abr./jun. 1992.

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 3/4, p. 214-221, apr. 2006.

GARCIA-VAZQUEZ, Z. *et al.* A serological survey of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs of two urban areas of Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 1-6, nov. 1995.

GIBBS, J. Effective Blocking Procedures. **CORNING Life Sciences: ELISA Technical Bulletin**, Massachusetts, n. 3, p. 1-6, 2001.

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

GONZALEZ, C. R. *et al.* An entomological and seroepidemiological study of the vectorial-transmission risk of Chagas disease in the coast of northern Chile. **Medical and Veterinary Entomology**, Boston, v. 29, n. 4, p. 387-392, dec. 2015.

GRANJON, E. *et al.* Development of a novel multiplex immunoassay multi-cruzi for the serological confirmation of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. e0004596, apr. 2016.

GUEDES, P. M. *et al.* The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. **Acta Tropica**, Basel, v. 84, n. 1, p. 9-17, oct. 2002.

GUEDES, P. M. *et al.* Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production during the acute infection phase. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 130, n. 1-2, p. 43-52, july 2009.

GUIMARÃES-PEIXOTO, R. P. *et al.* Development of the multi-epitope chimeric antigen rqTSA-25 from *Taenia saginata* for serological diagnosis of bovine cysticercosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 4, p. e0006371, apr. 2018.

GÜRTLER, R. E. *et al.* Household prevalence of seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in three rural villages in northwest Argentina: environmental, demographic, and entomologic associations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 5, p. 741-749, nov. 1998.

GÜRTLER, R. E. *et al.* Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 73, n. 1, p. 95-103, july 2005.

GÜRTLER, R. E. *et al.* Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. **Parasitology**, London, v. 134, pt 1, p. 69-82, jan. 2007.

- GÜRTLER, R. E. *et al.* Domestic animal hosts strongly influence human-feeding rates of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Argentina. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e2894, may 2014.
- GÜRTLER, R. E.; CARDINAL, M. V. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, Basel, v. 151, p. 32-50, nov. 2015.
- GUZMÁN-GÓMEZ, D. *et al.* Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. **Parasites and Vectors**, London, v. 8, p. 466, sept. 2015.
- HERRERA, L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 99, n. 5, p. 379-388, may 2005.
- JANSEN, A. M. Importância dos animais domésticos sentinelas na identificação de áreas de risco de emergência de doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, supl. 2, jul. 2008.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C.; ROQUE, A. L. Ecological aspects of *Trypanosoma cruzi*: Wild hosts and reservoirs. **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. p. 243-264, 2nd Ed. Amsterdam mar. 2017.
- JIMENEZ-COELLO, M. *et al.* American trypanosomiasis in dogs from an urban and rural area of Yucatan, Mexico. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 8, n. 6, p. 755-761, dec. 2008.
- JIMÉNEZ-COELLO, M. *et al.* Stray dogs as reservoirs of the zoonotic agents *Leptospira interrogans*, *Trypanosoma cruzi*, and *Aspergillus* spp. in an urban area of Chiapas in southern Mexico. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 10, n. 2, p. 135-141, mar. 2010a.
- JIMÉNEZ-COELLO, M. *et al.* Serological survey of American trypanosomiasis in dogs and their owners from an urban area of Mérida Yucatàn, Mexico. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 57, n. 1-2, p. 33-36, feb. 2010b.
- KJOS, S. A. *et al.* Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, n. 3/4, p. 249-256, apr. 2008.
- KLOTZ *et al.* Kissing bugs in the United States: risk for vector-borne disease in humans. **Environmental Health Insights**, Auckland, v. 8, suppl. 2, p. 49, dec. 2014.
- KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 16, supl. 1, p. 13-34, dec. 2009.
- 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.

- LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W. L. Experimental Chagas' disease in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 1, p. 59-71, jan./mar. 1992.
- LAURICELLA, M. A. *et al.* Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) infection in naturally infected dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 4, p. 501-507, jul./ago. 1998.
- LIMA, M. M. *et al.* Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 106, n. 3, p. 143-149, mar. 2012.
- LUCHEIS, S. B. *et al.* Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region, São Paulo State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 492-509, out./dez. 2005.
- MARTÍNEZ, I. *et al.* Seroprevalence and major antigens recognized by sera from *Trypanosoma cruzi*-infected dogs from Jalisco, México. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 46, n. 2, p. 85-90, abr. 2014.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A. *et al.* Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 1, p. 53-59, jan. 2001.
- MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e1508, feb. 2012.
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 17-30, jul. 2009.
- MONJE-RUMI, M. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: Mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 29, p. 53-59, jan. 2015.
- MONTENEGRO, V. M. *et al.* Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 491-4, 2002.
- MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: Proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1861-1875, 2004.
- NAGAJYOTHI, F. *et al.* Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 219-225, jul. 2009.

NIETO, P. D. *et al.* Comparison of two immunochromatographic assays and the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in south central Louisiana. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 3–4, p. 241–247, 2009.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Anti-*Trypanosoma cruzi* assays: operational characteristics **World Health Organization Press**, Genève: [s.n.], 2010a. Disponível em: www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/anti_t_cruzi_assays.pdf.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases (First WHO report on neglected tropical diseases). **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, Genève: 2010b. 184 p. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44440/9789241564090_eng.pdf;jsessionid=FC0C607B3BB8731CA092F358A47E753D?sequence=1.

ORTIZ, S. *et al.* Transferability of *Trypanosoma cruzi* from mixed human host infection to *Triatoma infestans* and from insects to axenic culture. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 33-36, feb. 2015.

OTRANTO, D. *et al.* Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 172, n. 3/4, p. 323-332, sept. 2010.

PENG, T. *et al.* Improvement of the stability of immunochromatographic assay for the quantitative detection of clenbuterol in swine urine. **Analytical Methods**, v. 6, n. 18, p. 7394-7398, sept. 2014.

PIACENZA, L. *et al.* Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, n. 13, p. 1455-1464, nov. 2009.

PINEDA, V. *et al.* Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 3/4, p. 360-363, june 2011.

PORTUGAL-GARCÍA, C. *et al.* Anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en humanos y perros y presencia del parásito en *Meccus pallidipennis* en la localidad de Puente Pantitlán, Morelos, México. **Revista Biomédica**, Mérida, v. 22, n. 3, p. 67-75, sept./dec. 2011.

QUIJANO-HERNÁNDEZ, I. A. *et al.* Seroprevalence survey of American trypanosomiasis in central valley of Toluca. **The Scientific World Journal**, Boynton Beach, p. 1-3, apr. 2012.

RABINOVICH, J. E. *et al.* Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p. 479–494, jun. 2011.

RAMÍREZ, J. D. *et al.* First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v. 61, n. 7, p. 477-479, nov. 2014.

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

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

ROCHA, F. L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the *T. cruzi* transmission chain. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e67463, july 2013a.

ROCHA, F. L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. **Parasitology**, London, v. 140, n. 2, p. 160-170, feb. 2013b.

ROQUE, A. L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 193, n. 1/3, p. 71-77, 2013.

ROSÁRIO, E. Y. *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 2, p. 197-203, apr. 2005.

ROSYPAL, A. C. *et al.* Seroprevalence of canine leishmaniasis and American trypanosomiasis in dogs from Grenada, West Indies. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 96, n. 1, p. 228-229, feb. 2010.

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

SALDAÑA, A. *et al.* Risk factors associated with *Trypanosoma cruzi* exposure in domestic dogs from a rural community in Panama. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 7, p. 936-944, nov. 2015.

SÁNCHEZ, B. *et al.* Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. **Archives of Medical Research**, New York, v. 32, n. 5, p. 382-388, sept./oct. 2001.

SANTOS, F. L. **Caracterização do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da doença de Chagas.** 2016. Tese (Doutorado em Biociências em Saúde e Biotecnologia) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/xmlui/handle/icict/14500>.

- 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**, Baltimore, v. 94, n. 5, p. 1034-1039, may 2016a.
- SANTOS, F. L. *et al.* Performance assessment of four chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens based on antigen-antibody detection for diagnosis of chronic chagas disease. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. 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, n. 3, p. e0005433, mar. 2017a.
- SANTOS, F. L. *et al.* Performance assessment of a *Trypanosoma cruzi* chimeric antigen in multiplex liquid microarray assays. **Journal Clinical Microbiology**, Boston, v. 55, p. 2934 – 2945. jun. 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00851-17>
- SANTOS, F. L. *et al.* Highly accurate chimeric proteins for the serological diagnosis of chronic Chagas disease: a latent class analysis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 99, n. 5, p. 1174-1179, nov. 2018.
- SARKAR, S. *et al.* Chagas disease risk in Texas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 10, p. e836, oct. 2010.
- SARQUIS, O. *et al.* Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 263-270, may. 2004.
- SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, jul. 2010.
- SCHOFIELD, C. *Trypanosoma cruzi* - the vector-parasite paradox. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 4, p. 535-544, jul./aug. 2000.
- SHADOMY, S. V. *et al.* Combined use of enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry to detect antibodies to *Trypanosoma cruzi* in domestic canines in Texas. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, n. 2, p. 313-319, mar. 2004.
- SILVA-DOS-SANTOS, D. *et al.* Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 4, p. e0005507, apr. 2017.
- SOARES-SILVA, M. *et al.* The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway: Role in immune evasion by trypanosomatids. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 1–9, feb. 2016.
- SOSA-JURADO, F. *et al.* Factores bióticos y abióticos que determinan la seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en el municipio de Palmar de Bravo, Puebla, México. **Salud Pública de México**, Morelos, v. 46, n. 1, p. 39-48, jan./feb. 2004.

- SOUZA, A. I. *et al.* Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1351-1356, ago. 2008.
- STEINDEL, M. *et al.* Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 60, n. 1, p. 25-32, jan. 2008.
- STEINIGER, S. C. *et al.* Fundamental characteristics of the expressed immunoglobulin VH and VL repertoire in different canine breeds in comparison with those of humans and mice. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 71-78, may 2014.
- STEVENS, L. *et al.* Vector blood meals and Chagas disease transmission potential, United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 18, n. 4, p. 646-649, apr. 2012.
- TAHIR, D. *et al.* Molecular and serological investigation of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in French Guiana. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, Amsterdam, v. 12, p. 106-109, may 2018.
- TEIXEIRA, D. E. *et al.* Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. e1749, aug. 2012.
- TORRES, M. Estudo do miocárdio na moléstia de Chagas (forma aguda). I - Alterações da fibra muscular cardíaca. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 114-139, 1917.
- TORRES, M.; VILLAÇA, J. Encefalite e mielite causadas por um Tripanozomo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 80-89, 1919.
- UMEZAWA, E. S. *et al.* TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, Basel, v. 111, n. 1, p. 15-20, July 2009.
- VEGA BENEDETTI, A. F. *et al.* Performance of different *Trypanosoma cruzi* antigens in the diagnosis of Chagas disease in patients with American cutaneous leishmaniasis from a co-endemic region in Argentina. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 1103-1109, sept. 2013.
- WILD, D. The Immunoassay Handbook. 4^a ed. Oxford: Elsevier, 1013p, may. 2013.
- WILLIAMS, G. D. *et al.* Naturally occurring trypanosomiasis (Chagas' disease) in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 171, n. 2, p. 171-177, jul. 1977.
- XAVIER, S. C. *et al.* Lower richness of small wild mammal species and Chagas disease risk. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e1647, may. 2012.

- XAVIER, S. C. *et al.* Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e2878, may. 2014.
- XIAO, Y.; ISAACS, S. N. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA) - not all BSAs are alike. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 384, n. 1/2, p. 148-151, oct. 2013.
- YAMAGATA, Y.; NAKAGAWA, J. Control of Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, London, v. 61, p. 129-165, 2006.
- YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 101-107, jul. 2009.
- ZANETTE, M. F. *et al.* Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 1, p. 105-107, jan./fev. 2014.
- ZHANG, J. *et al.* Apoptosis in a canine model of acute Chagasic myocarditis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 31, n. 3, p. 581-596, mar. 1999.
- ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, Basel, v. 184, p. 38-52, aug. 2018.

APÊNDICE A – MANUSCRITO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO



RESEARCH ARTICLE

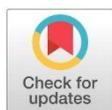
Performance of recombinant chimeric proteins in the serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs

Leonardo M. Leony¹✉, Natália E. M. Freitas¹✉, Rodrigo P. Del-Rei², Claudia M. Carneiro³, Alexandre B. Reis³, Ana Maria Jansen⁴, Samanta C. C. Xavier⁴, Yara M. Gomes⁵, Edmilson D. Silva⁶, Mitermayer G. Reis^{1,7,8}, Deborah B. M. Fraga¹, Paola A. F. Celedon⁹, Nilson I. T. Zanchin¹⁰, Filipe Dantas-Torres⁵, Fred L. N. Santos¹*✉

1 Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil, **2** Faculty of Technology and Sciences of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, **3** Immunopathology Laboratory, Nucleus of Research in Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, **4** Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil, **6** Immunobiological Technology Institute, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **7** Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Bahia, Bahia, Brazil, **8** Department of Epidemiology of Microbial Diseases, School of Public Health, Yale University, New Haven, Connecticut, United States of America, **9** Molecular Biology Institute of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil, **10** Carlos Chagas Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Curitiba, Paraná, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

* fred.santos@fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Leony LM, Freitas NEM, Del-Rei RP, Carneiro CM, Reis AB, Jansen AM, et al. (2019) Performance of recombinant chimeric proteins in the serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 13(6): e0007545. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007545>

Editor: Claudia Patricia Herrera, Tulane University, UNITED STATES

Received: January 15, 2019

Accepted: June 11, 2019

Published: June 26, 2019

Copyright: © 2019 Leony et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All data are fully available in the [S2](#) and [S3](#) Tables.

Funding: This work was supported by Gonçalo Moniz Institute (Research Excellence Program - PROEP/IGM, Grant: 400904/2013-6; Internal Research Support Program - PIAP Jovem+, Grant: PIAP-001/2017), and in part by the Coordination of Superior Level Staff Improvement - Brazil (CAPES, Grant PROEX 0720/2018). Brazilian National Council for Scientific and Technological

Abstract

Background

Dogs are considered sentinels in areas of *Trypanosoma cruzi* transmission risk to humans. ELISA is generally the method of choice for diagnosing *T. cruzi* exposure in dogs, but its performance substantially depends on the antigenic matrix employed. In previous studies, our group has developed four chimeric antigens (IBMP-8.1, 8.2, 8.3, and 8.4) and evaluated their potential for diagnosing *T. cruzi* exposure in humans. For human sera, these chimeric antigens presented superior diagnostic performances as compared to commercial tests available in Brazil, Spain, and Argentina. Therefore, in this study we have evaluated the potential of these antigenic proteins for detection of anti-*T. cruzi* IgG antibodies in dog sera.

Methodology/Principal findings

The IBMP-ELISA assays were optimized by checkerboard titration. Subsequently, the diagnostic potential was validated through analysis of ROC curves and the performance of the tests was determined using double entry tables. Cross-reactivity was also evaluated for babesiosis, ehrlichiosis, dirofilariasis, anaplasmosis, and visceral leishmaniasis. Best performance was shown by IBMP-8.3 and IBMP-8.4, although all four antigens demonstrated a high diagnostic performance with 46 positive and 149 negative samples tested. IBMP-8.3 demonstrated 100% sensitivity, followed by IBMP-8.4 (96.7–100%), IBMP-8.2 (73.3–87.5%), and IBMP-8.1 (50–100%). The highest specificities were achieved with IBMP-8.2

Development (CNPq) and Research Support Foundation for the State of Rio de Janeiro (FAPERJ). MGR, NITZ, CMC, ABR and AMJ are research fellows of CNPq. This study was funded by Oswaldo Cruz Foundation- FIOCRUZ; Vice-Presidency of Research and Reference Laboratories (VPPLR/FIOCRUZ) for investing in our research; the European Union Seventh Framework Program Grant 223034 – ChagasEpiNet. Serum samples from panel 3 were collected under the frame of a research sponsored by Bayer Animal Health [27]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: FDT has received funding from Bayer Animal Health to conduct a clinical trial to assess the efficacy of flumethrin plus imidacloprid collar in preventing vector-borne pathogen infections on dogs in Brazil. He also received honoraria for talks in scientific meetings organized by Bayer Animal Health and Boehringer Ingelheim.

(100%) and IBMP-8.4 (100%), followed by IBMP-8.3 (96.7–97.5%) and IBMP 8.1 (89.1–100%).

Conclusions/Significance

The use of chimeric antigenic matrices in immunoassays for anti-*T. cruzi* IgG antibody detection in sera of infected dogs was shown to be a promising tool for veterinary diagnosis and epidemiological studies. The chimeric antigens used in this work allowed also to overcome the common hurdles related to serodiagnosis of *T. cruzi* infection, especially regarding variation of efficiency parameters according to different strains and cross-reactivity with other infectious diseases.

Author summary

Despite dogs being considered *T. cruzi*'s most important domestic sentinel/reservoir and also suffering from the outcomes of the infection, there has never been a commercially available test to diagnose *T. cruzi* infection in dogs. As such, our group's objective was to develop a state-of-the-art serological diagnostic test utilizing four chimeric antigens (IBMP-8.1, 8.2, 8.3, and 8.4) in an ELISA platform to accurately identify canine anti-*T. cruzi* IgG antibodies. The IBMP-ELISA assays were optimized, evaluated for cross-reactivity towards multiple canine parasite's, including *Leishmania* spp., its diagnostic potential was validated and the test's performance was determined using double entry tables. The IBMP-8.3 antigen demonstrated 100% sensitivity, followed by IBMP-8.4, whereas the highest specificities were achieved with IBMP-8.2 (100%) and IBMP-8.4 (100%). Therefore, we've concluded that the serodiagnosis through anti-*T. cruzi* IgG detection in dogs, utilizing chimeric antigenic matrices in immunoassays is a promising tool for veterinary diagnosis and epidemiological surveillance. Furthermore, the use of chimeric antigens efficiently addressed common hurdles related to *T. cruzi* serodiagnosis, especially regarding efficiency variation in response to different strains and cross-reactivity.

Introduction

Chagas disease (CD) is a vector-borne, neglected parasitic illness caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. According to recent estimates, approximately 6 million people are affected by CD in 21 Latin American endemic countries with ~14,000 deaths per year being attributed to this disease [1]. Increased international migration of infected individuals has spread CD toward non-endemic settings, including North American, European, Asian, and Oceanian countries [2,3].

Trypanosoma cruzi transmission involves complex networks of interactions of wild and domestic mammalian hosts, and triatomine vectors. Dogs, cats, pigs, and goats are the main domestic mammalian species investigated for *T. cruzi* infection in endemic areas. Dogs and cats represent the first domestic *T. cruzi* hosts studied by Carlos Chagas: a cat in Lassance (Minas Gerais state, Brazil) was the first mammalian host in which he found trypomastigote forms of the parasite in the blood, whereas dogs were among the first experimental models used in his research. Since then, several studies have shown that dogs and cats can be

competent *T. cruzi* reservoirs, but as described for the other mammals, their importance in the transmission cycle varies according to the geographic regions and local characteristics. Particularly, domestic dogs have been commonly implicated as blood meal sources for triatomine vectors [4,5]. In the Argentinean Gran Chaco, both dogs and cats are epidemiologically important and described as highly infective to triatomine vectors [4,5]. Active transmission, which includes symptomatic dogs, was also observed in the southern United States [6,7] and throughout the Americas [8]. A different scenario is seen in Brazil. Despite being exposed to parasite (as evidenced by the high seropositive rates by IFAT and ELISA), *T. cruzi* isolation from dogs, whether by hemoculture or xenodiagnoses, is rarely documented [6–8]. However, dogs may act as efficient sentinel animals. Xavier et al. [7] observed positive association between serologically positive dogs and: (1) lower diversity of small mammal fauna and (2) high rates of small mammal fauna with high infective competence as expressed by positive hemocultures.

The presence of *T. cruzi*-infected dogs in households is associated with higher risk of human infection; as such, they can be used as sentinels [9]. Furthermore, dogs may eventually develop American trypanosomiasis (AT) by *T. cruzi*, presenting morphofunctional cardiac lesions or sudden death similar to those seen in humans [10,11]. Hence, AT may represent a health risk for dogs [12]. The pivotal importance is that seropositive dogs reflect exposure to *T. cruzi* and indicate the presence of this parasite in areas where these animals roam. The knowledge of *T. cruzi* infection in these hosts may direct epidemiological measures to risk settings even before the occurrence of human cases.

Despite the importance of dogs in the epidemiological scenario of *T. cruzi* transmission, there are no commercial serological tests to diagnose canine *T. cruzi*-infection. Several studies employed conventional in-house ELISA to diagnose *T. cruzi* exposure in dogs, which uses either fractionated *T. cruzi* lysates or whole-cell epimastigote homogenates as antigenic matrices [10,13–15]. This complex antigenic mixture of the variable component is highly sensitive and some drawbacks have been already described, such as difficult standardization, low specificity, and cross-reactivity with *Leishmania* spp., and other trypanosomatids [16,17]. Therefore, accurate serological diagnostic tests are needed to fill this gap.

Multi-epitope recombinant proteins, composed of several antigenically distinct amino acid sequences, have been proposed to improve the diagnostic performance of human chronic CD diagnosis [18–23]. Four multi-epitope proteins, namely IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3, and IBMP-8.4, have been expressed by our team and their diagnostic potential has previously been evaluated on several technical platforms to diagnose human CD [18–20]. These antigens presented high levels of sensitivity, specificity, and accuracy for samples from both endemic and non-endemic areas for several geographic regions [19,24,25]. Cross-reactivity has already been evaluated and only a small number of samples were classified as reagent for various infectious diseases of clinical interest, including leishmaniasis [19,26]. The results obtained for human samples are very promising. Therefore, in this study, we aimed to assess the efficiency of these multi-epitope proteins as an antigenic matrix in serological assays for anti-*T. cruzi* IgG antibody detection in dogs with chronic *T. cruzi* infection.

Materials and methods

Ethical statements

This investigation was approved by the Animal Ethical Committee from Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, with the number 002/2017. The samples were provided by the biorepositories of the Trypanosomatid Biology Laboratory (Fio-cruz, Rio de Janeiro), Immunopathology Laboratory of the Nucleus of Research in Biological

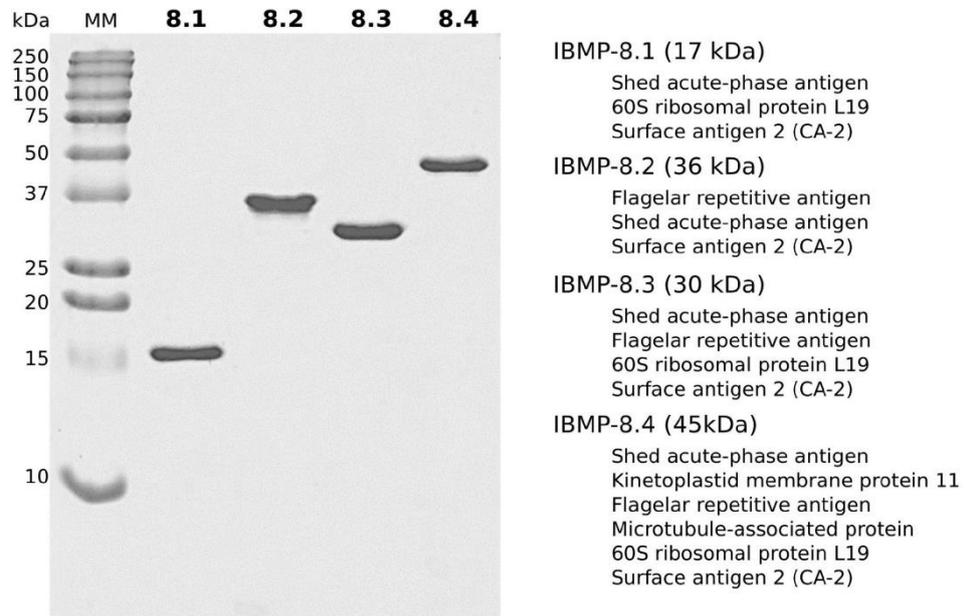


Fig 1. SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant showing the chimeric purified antigens. The *T. cruzi* proteins whose antigenic regions were used to construct the chimeric antigens are described on the right. Lanes 8.1 to 8.4 indicate the IBMP multi-epitope antigens (1 μ g of each antigen was loaded per lane). MM: molecular weight marker.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007545.g001>

Sciences (NUPEB—Federal University of Ouro Preto—UFOP), Host-Parasite Interaction and Epidemiology Laboratory (Fiocruz-BA), and Immunoparasitology Laboratory (Fiocruz-Pernambuco).

Chimeric proteins synthesis

The multi-epitope antigens used in the indirect ELISA were obtained according to Santos *et al.* [18]. Briefly, the synthetic genes were subcloned into the pET28a vector and expressed in *Escherichia coli* BL21-Star (ThermoFisher Scientific). Expression was induced with 0.5 μ M of IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) and the soluble proteins purified by both ion exchange and affinity chromatography. Finally, the purified multi-epitope antigens were quantified by Qubit fluorometric assay (ThermoFisher Scientific). Fig 1 illustrates the SDS-PAGE of the antigens after purification. Details about IBMP composition has been seen in previous studies of our group [18,19,23].

Sample collections

Three convenience canine serum panels from dogs of different origins were used in this investigation (Fig 2). The first panel (panel 1) was composed of either non-infected (n = 31) or experimentally infected mongrel dogs with the Colombian (n = 12), Y (n = 8) and Berenice

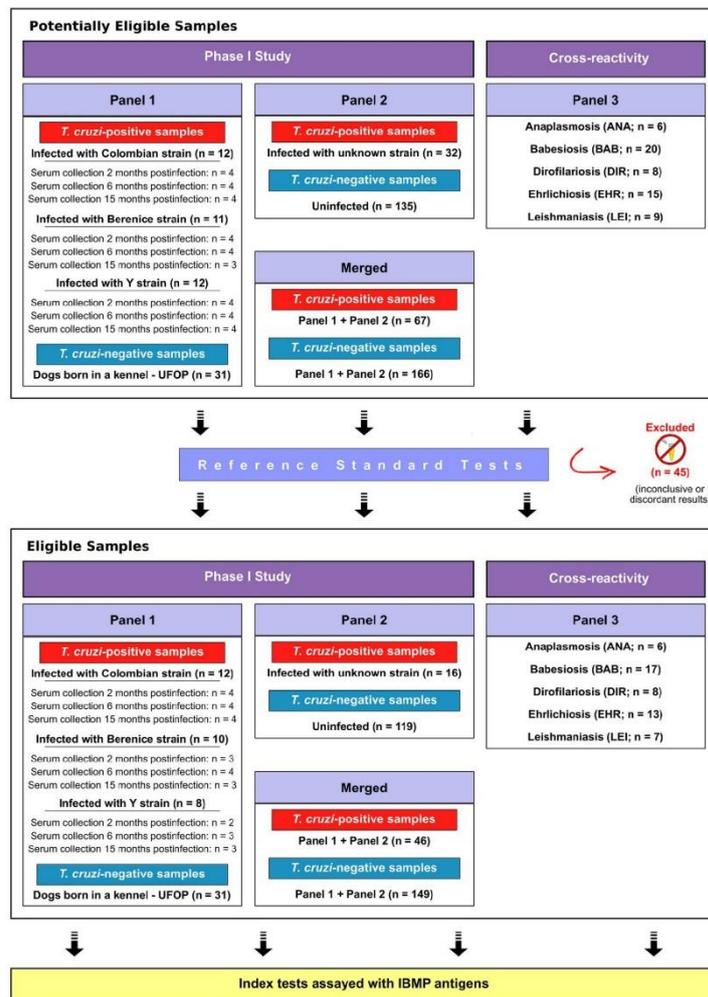


Fig 2. STARD flowchart to evaluate the diagnostic performance of IBMP chimeric antigens to detect anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in dog sera. Reference Standard Tests: in-house ELISA using fractionated lysates of *T. cruzi* at the epimastigote and modified Gold ELISA Chagas (Rem Indústria e Comércio, Brazil).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007545.g002>

(n = 10) strains of *T. cruzi*. These samples were obtained from animals born and maintained at UFOP's Animal Science Center kennel, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. Serum samples from experimentally infected dogs were collected 2–15 months after *T. cruzi* inoculation. The second panel (panel 2), composed of *T. cruzi*-negative (n = 119) and positive (n = 16) samples,

was provided by the biorepository of the Trypanosomatid Biology Laboratory (Fiocruz-RJ) or the Host-Parasite Interaction and Epidemiology Laboratory (Fiocruz-BA). These samples were obtained from previous investigations and were collected in several *T. cruzi* endemic settings from Brazil [27–29]. Combined analysis of panel 1 and panel 2 was denominated as “Merged.” In addition to *T. cruzi*-positive and negative sera, 51 samples from animals with unrelated pathogens infection (panel 3) were combined into the sample set to assess cross-reactivity. The unrelated pathogens infection evaluated included anaplasmosis (n = 6), babesiosis (n = 17), dirofilariosis (n = 8), and ehrlichiosis (n = 13). These samples were from the biorepository of the Immunoparasitology Laboratory (Fiocruz-PE) and previously characterized by molecular and serological methods [27]. Additionally, sera from mongrel dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* (n = 7) were provided by the Immunopathology Laboratory (UFOP) and assessed herein [30].

Sera characterization

All samples were initially re-assayed for IgG antibodies against *T. cruzi* using two in-house ELISA. In the first test, 100 μ l of fractionated lysates of *T. cruzi* at the epimastigote stage (2.4 μ g/ml) in carbonate-bicarbonate buffer (50 mM, pH 9.6) was used to sensitize the microplates for 60 min at 37°C. Following washing steps with PBS 0.05% Tween 20 (PBS-T), the microplates were blocked with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 2% milk lecithin for 30 min at 37°C. After washing, 100 μ l of anti-dog IgG-HRP conjugated (Sigma, St. Louis, USA), loaded at 1:40,000 in PBS, were added and the microplates incubated for 30 min at 37°C. Following incubation and washing cycles, 100 μ l of TMB substrate (tetra-methyl-benzidine; Sigma, St. Louis, USA) were added, and the microplates were incubated in the dark at room temperature (RT) for 30 min. Then, the enzymatic reactions were stopped by adding 50 μ l of 0.5 M H₂SO₄, and the optical density (OD) at 450 nm was read in a MultiskanFC microplate spectrophotometer (Thermo Scientific, Finland). The other test refers to a modified Gold ELISA Chagas kit (Rem Indústria e Comércio, São Paulo, Brazil). In this test, dilutions of anti-dog IgG-HRP conjugate tested were 1:20,000, 1:40,000, and 1:80,000 (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil). Similarly, *T. cruzi*-positive and negative serum samples were assayed at dilutions 1:100, 1:200, 1:400, and 1:800. The best conditions to separate negative and positive samples (delta median— Δ) were conjugated antibody diluted at 1:40,000 and serum dilution at 1:800. The cut-off (CO) was established by using the mean optical absorbance of negative sera plus three standard deviations. If a sample's optical density (OD) value fell within \pm 10% of the CO value, it was considered as an indeterminate result (or in the grey zone). Samples with repeatedly discrepant results between both tests or inconclusive in one of them (or within the gray zone) were excluded. These two in-house ELISA were used as reference tests to determine the presence of IgG anti-*T. cruzi* antibodies in the investigated samples. Each sample was given an identifier code in the laboratory to ensure a blinded analysis.

IBMP-ELISA optimization and procedure

The optimal dilutions of the antigen coating, as well as the dilutions of the antibody-enzyme conjugate (HRP) and serum concentrations, were determined by cross-titration. The selected conditions were established considering the largest difference in the average optical density (OD) value between positive and negative samples. The conditions were considered satisfactory when negative samples' OD averaged below or around 0.25 and positive samples above or next to 1.00. The selected conditions for each chimeric antigen were established

considering the highest difference between the median OD for positive and negative *T. cruzi* samples (delta median— Δ). Flat bottom, high-binding, transparent “Maxisorp” 96-well microplates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with IBMP antigens (12.5 ng, 25 ng, and 50 ng) in carbonate-bicarbonate buffer (50 mM, pH 9.6). Following the blocking step with Well Champion reagent (Kem-En-Tec, Taastrup, Denmark), 100 μ l of a serial dilution of each serum sample (1:100 and 1:200) diluted in phosphate-buffered saline (pH 7.4) was added to the selected well and the microplate incubated at 37 °C for 60 min. After washing with phosphate-buffered saline-0.05% Tween 20, 100 μ L of HRP-conjugated goat anti-dog IgG (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil), diluted at 1:20,000, 1:40,000, and 1:80,000 ratios in phosphate-buffered saline, were added to the wells and the microplate incubated at 37 °C for 30 min. After another washing cycle, 100 μ l of TMB substrate (tetramethyl-benzidine; Kem-En-Tec, Taastrup, Denmark) were added to each well and the microplates incubated in the dark at RT for 10 min. The reaction was interrupted by adding 50 μ l of 0.3 M H₂SO₄ to each well. The OD was measured using a 450nm filter (SPECTRAMax 340PC, USA). CO values were established under ROC curve analysis. The results were normalized as a reactivity index (RI) that denotes the ratio between the OD of the samples and the CO. Samples that resulted in RI > 1.0 were considered positive. If a sample’s RI value was within \pm 10% of 1.0, it was classified as inconclusive (or in the grey zone). Each sample was given an identifier code in the laboratory to ensure a blinded analysis.

Statistical analysis

Data were analyzed using a scatter plot graphing software (GraphPad Prism version 7, San Diego, CA, USA). Continuous variables were presented as geometric mean \pm standard deviation (SD). The Shapiro-Wilk test was used to test data normality. When the assumed homogeneity was confirmed, Student’s t-test was used. If not, Wilcoxon’s signed-rank test was employed. All analyses were two-tailed, and p values under 5% were considered significant ($p < 0.05$). Areas under the ROC curve (AUC) were calculated to assess the global accuracy for each IBMP antigen, which can be classified as outstanding (1.0), elevated (0.82–0.99), moderate (0.62–0.81), or low (0.51–0.61) [31]. IBMP-ELISA performance parameters were determined using a dichotomous approach and compared regarding sensitivity (Se), specificity (Sp), and accuracy (Ac). A 95% confidence interval (95% CI) was calculated to address precision of the proportion estimates. The agreement strength between the reference standard tests and IBMP-ELISA was established by Cohen’s kappa (κ) analysis, which was interpreted as follows: $1.0 \leq \kappa \leq 0.81$ (almost perfect agreement), $0.80 \leq \kappa \leq 0.61$ (substantial agreement), $0.60 \leq \kappa \leq 0.41$ (moderate agreement), $0.40 \leq \kappa \leq 0.21$ (fair agreement), $0.20 \leq \kappa \leq 0$ (slight agreement), and $\kappa = 0$ (poor agreement) [32]. A checklist (S1 Table) and flowchart (Fig 2) are provided according to the Standards for the Reporting of Diagnostic accuracy studies (STARD) guidelines.

Results

Chimeric antigen-ELISA optimization

The optimal dilutions of sera, antigens and antibody-enzyme conjugate were assessed by checkerboard titration. The best condition was chosen by considering the higher Δ median between *T. cruzi*-positive and negative samples. The pre-established criteria (OD < 0.25 for negative samples and OD > 1.00 for *T. cruzi*-positive samples) conditions were classified as satisfactory with the antibody-enzyme conjugate at a dilution of 1:20,000 for IBMP-8.3 and 1:40,000 for IBMP-8.1, IBMP-8.2, and IBMP-8.4. With respect to serum dilution, all tests

presented higher Δ median when diluted at 1:100 compared to 1:200). Conversely, the best quantity of antigen to sensitize each well varied from 25 ng for IBMP-8.1, IBMP-8.2, and IBMP-8.4 to 50 ng for the IBMP-8.3.

Chimeric antigen-ELISA performance

The phase I study was performed using two distinct serological panels. Panel 1 was composed of sera from dogs experimentally infected with three known strains of *T. cruzi*, whereas panel 2 was formed by sera from dogs naturally infected with unknown strains of *T. cruzi*. The merged analysis was also performed considering the samples from both panels 1 and 2 (Fig 3; individual data points are available in the S2 Table). Based on AUC values, all IBMP chimeric antigens were classified with either high or outstanding diagnostic potential, regardless of serum panel assayed. However, AUC values for IBMP-8.3 and IBMP-8.4 were statistically higher than those for IBMP-8.1 and IBMP-8.2. For *T. cruzi*-positive samples, IBMP-8.3 produced the highest RI value for merged analysis. No significant difference was observed between IBMP-8.3 and IBMP-8.4, considering overlap of 95% CI values. The lowest RI value was seen for IBMP-8.1. However, no differences were shown between IBMP-8.1 and IBMP-8.3 or IBMP-8.2 considering only panel 2. With respect to *T. cruzi*-negative samples, RI values were below 0.45 for all four chimeric antigens in all investigated panels.

IBMP-8.3 presented a sensitivity of 100% for all panels, followed by IBMP-8.4 (ranging from 96.7% to 100%), IBMP-8.2 (ranging from 73.3% to 87.5%), and IBMP-8.1 (ranging from 50% to 100%). Considering the merged panel, no statistical differences in sensitivity were observed for IBMP-8.3 and IBMP-8.4. Conversely, IBMP-8.1 showed the lowest sensitivity, mainly for *T. cruzi*-positive samples from panel 1 (Sen 50%). False-negative results, produced by this antigen, were due to six dogs infected with the Colombian strain, six with the Y strain, and three with Berenice strain, in which the serum collection occurred two months (nine animals: four infected with Colombian strain, two infected with Y strain, and three infected with Berenice strain), six months (three animals: one and two infected with Colombian and Y strain, respectively), and 15 months (three animals: one infected with Colombian strain and two infected with Y strain) postinfection. IBMP-8.2 also produced a high number of false-negative results, which was due to eight Colombian and one Y strain infected dogs, in which the serum collection occurred two months (three animals infected with Colombian strain), six months (two animals infected with Colombian strain), and 15 months (three animals: two infected with Colombian strain and one with Y strain) postinfection. The performance of IBMP-ELISA evaluated by accuracy showed values of 99% for IBMP-8.4, 98% for IBMP-8.3, and 94% for IBMP-8.2, without significant difference among them. Conversely, IBMP-8.1 was 85.6% accurate, with statistical difference compared with the other antigens (lack of 95% CI values overlapped).

By adopting an inconclusive zone of $1.0 \pm 10\%$, a small number of samples fell inside the grey zone using IBMP-8.2, IBMP-8.3, and IBMP-8.4. However, the RI values of six (2%) *T. cruzi*-negative samples fell in the grey zone when assayed with IBMP-8.1. All *T. cruzi*-negative samples fell inside the conclusive space when tested using IBMP-8.2 and IBMP-8.4. Two *T. cruzi*-negative samples presented inconclusive result when evaluated with IBMP-8.3. With respect to *T. cruzi*-positive samples, one sample was inconclusive when assayed with IBMP-8.3 or IBMP-8.4; and two samples tested by IBMP-8.2. Overall analysis showed that 0.33% of the samples assayed using IBMP-8.4, 1% using IBMP-8.2 or IBMP-8.3, and 2% using IBMP-8.1 presented RI values falling within the inconclusive result threshold.

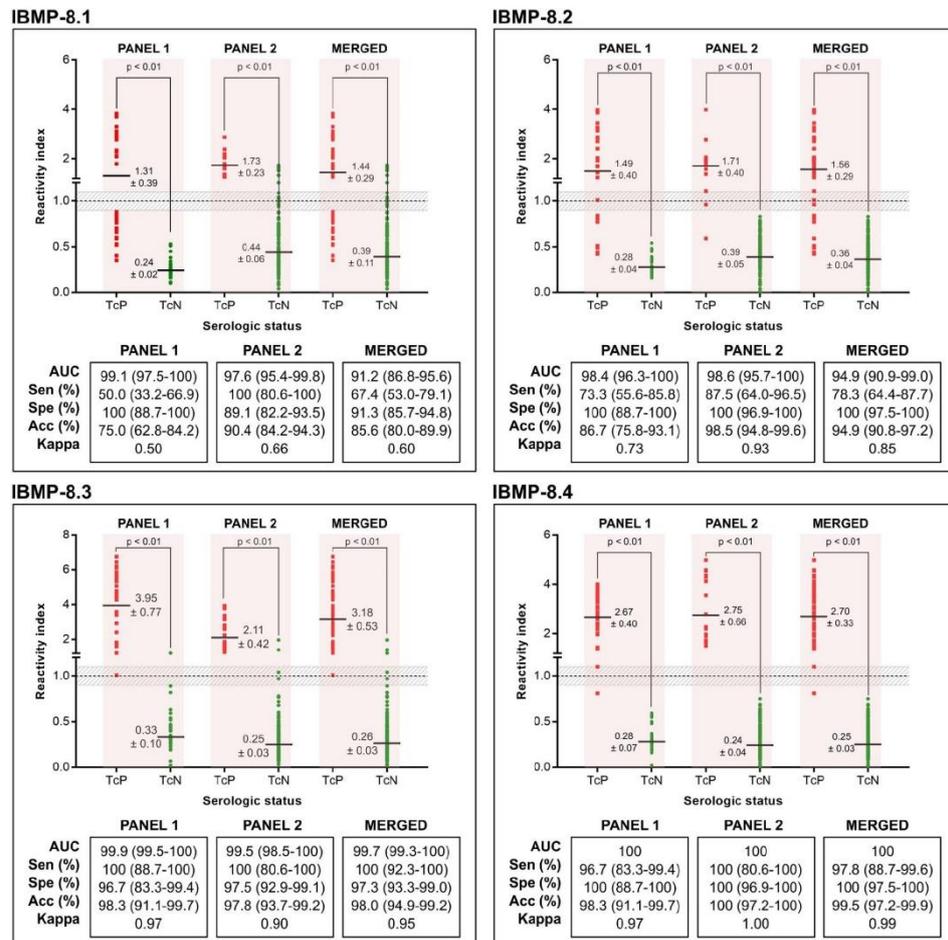


Fig 3. Reactivity index and diagnostic performance parameters obtained with serum samples from *T. cruzi*-infected and non-infected dogs. Panel 1 (dogs experimentally infected with Y, Berenice, and Colombian *T. cruzi* strains); Panel 2 (dogs naturally infected with unknown *T. cruzi* strains). The cut-off is set at the reactivity index value = 1.0 and the shadowed area represents the grey zone (RI = 1.0 ± 0.10). Horizontal lines and numbers for each result group represent the geometric means (± 95% CI). Acc (accuracy); AUC (area under curve); Sen (sensitivity); Spe (specificity); TcP (*T. cruzi*-positive samples); TcN (*T. cruzi*-negative samples).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007545.g003>

Analysis of *T. cruzi* strain background on antigen efficiency

In order to evaluate the heterogeneity of recognition of IBMP chimeric antigens by IgG anti-*T. cruzi* specific antibodies due to the expected genetic variability of parasite strains, RI and sensitivity values were compared using samples from dogs infected with *T. cruzi* Berenice (n = 10), Colombian (n = 12), and Y (n = 8) strains. Consistent with the results described above, the

highest RI values were found when *T. cruzi*-positive samples were assayed using IBMP-8.3, followed by IBMP-8.4. However, RI values for *T. cruzi* Berenice and Y strains were statistically higher for IBMP-8.3 compared to IBMP-8.4 (Fig 4; individual data points are available in the S2 Table). Contrarily, no statistical difference was found when *T. cruzi* Colombian strain was assayed with IBMP-8.3 and IBMP-8.4. The lowest RI values were found for IBMP-8.1. Only two out of eight samples were correctly classified as *T. cruzi*-positive, producing an RI value of 0.9. Similar RI value was observed when *T. cruzi* Colombian strain samples were tested using IBMP-8.2 antigen. As shown in Fig 4, IBMP-8.1 showed the lowest sensitivity value (25%). IBMP-8.2 also showed low sensitivity (41.7%). Higher sensitivity values were observed for IBMP-8.3 (100%) and IBMP-8.4 (87.5–100%).

Cross-reactivity assessment

IBMP-ELISA tests were performed to evaluate the antigenic cross-reactivity against antibodies of unrelated diseases ($RI \geq 1.0$) using a panel of 51 serum samples. As shown in Fig 5, no cross-reaction was observed when serum samples were assayed using IBMP-8.2 and IBMP-8.4 (individual RI values are given in the S3 Table). The incidence of cross-reactivity using IBMP-8.3 was negligible; only one *L. infantum*-positive sample produced a false-positive result. Conversely, 13.5% of the samples assayed using IBMP-8.1 presented positive result. At least one sample from each unrelated pathogen cross-reacted with this chimeric antigen, producing a cross-reaction incidence of 16.7% for anaplasmosis, 17.7% for babesiosis, 12.5% for dirofilariosis, and 15.4% for ehrlichiosis. No cross-reaction was observed when *L. infantum*-seropositive samples were assayed using IBMP-8.1.

Discussion

In the present study, we assessed the diagnostic performance of four recombinant chimeric antigens for detection of specific IgG anti-*T. cruzi* antibodies in sera from *T. cruzi*-positive dogs. The main objectives for surveillance of *T. cruzi* infection in domestic animals are to identify mammalian species that can act as amplifiers of parasite populations and to determine the mammalian species that can act as bioindicators (sentinels) of *T. cruzi* transmission risk to humans. It is known that, similar to what occurs in *Leishmania* spp. infection, in areas that present a high prevalence of *T. cruzi* infection in wild mammalian and triatomine hosts, domestic and peridomestic (synanthropic) mammalian species are exposed to infection, a scenario that favors establishment of human CD in that same area [7]. The antigens assayed in this work exhibited a high diagnostic efficiency. Indeed, the AUC values were higher than 90% for all antigens, indicating an optimal discriminative power between *T. cruzi*-positive and negative canine sera. IBMP-8.3 and IBMP-8.4 are of particular interest since they presented AUC values of 99.7% and 100%, respectively. These data are similar to previous results obtained by our group when these *T. cruzi* antigens were assessed to diagnose CD in humans [18–20]. Currently, human chronic CD diagnosis is troublesome due to the lack of a gold-standard serological test and the only gold standard tests based on *T. cruzi* DNA detection are solely applicable in the brief initial stage of the infection (acute phase). However, there is currently a significant difference in performance among the commercial tests due to the high genetic variability of the parasite and the employed antigenic matrices used to capture specific antibodies [18,33]. Hence, the World Health Organization recommends the concomitant use of two antigenically distinct commercial tests to diagnose *T. cruzi* infection in humans [34]. The diagnosis of the *T. cruzi* infection in dogs is even more difficult, owing to the absence of validated tests. Most studies usually employ either fractionated *T. cruzi* lysates or whole-cell epimastigote homogenates as antigenic matrices [10,13–15], which can lead to difficulties in standardizing, low

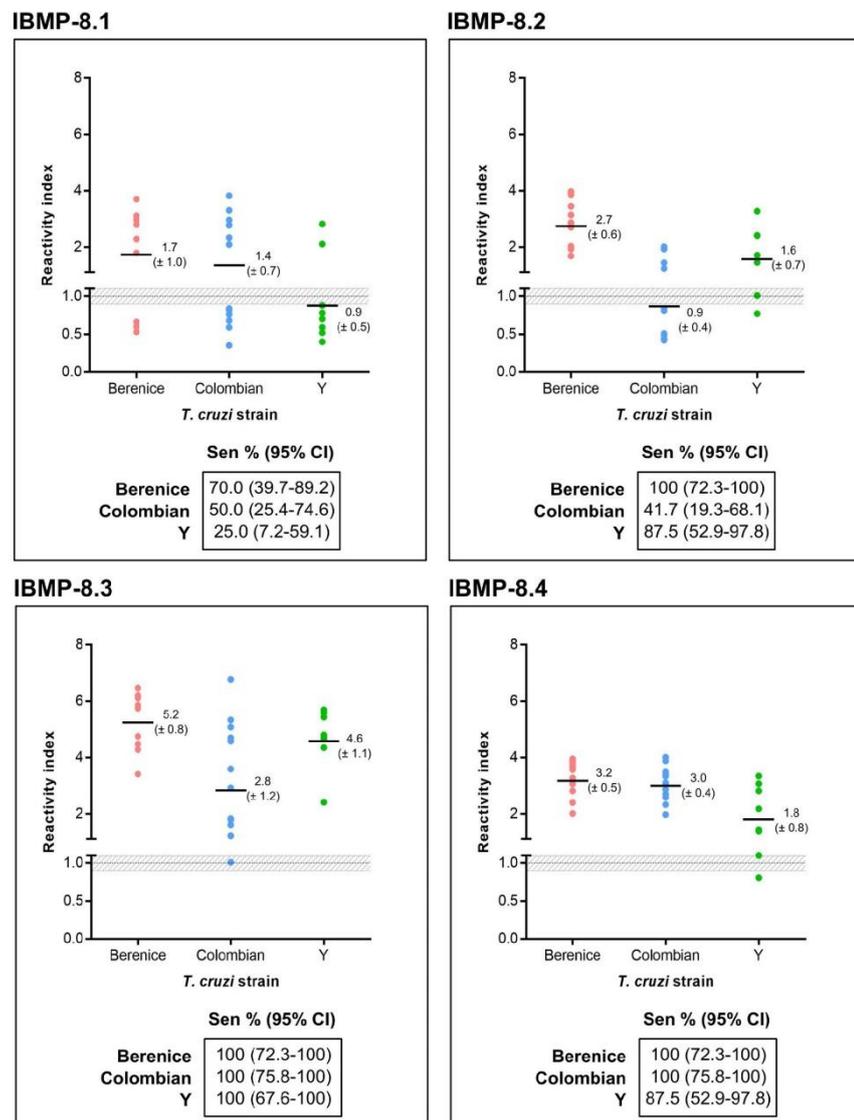


Fig 4. Reactivity index for antigen performance for the different *Trypanosoma cruzi* strains tested. The cut-off is set at the reactivity index value = 1.0 and the shadowed area represents the grey zone (RI = 1.0 ± 0.10). Horizontal lines and numbers for each results group represent the geometric means (± 95% CI). CI (confidence interval); Sen (sensitivity).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007545.g004>

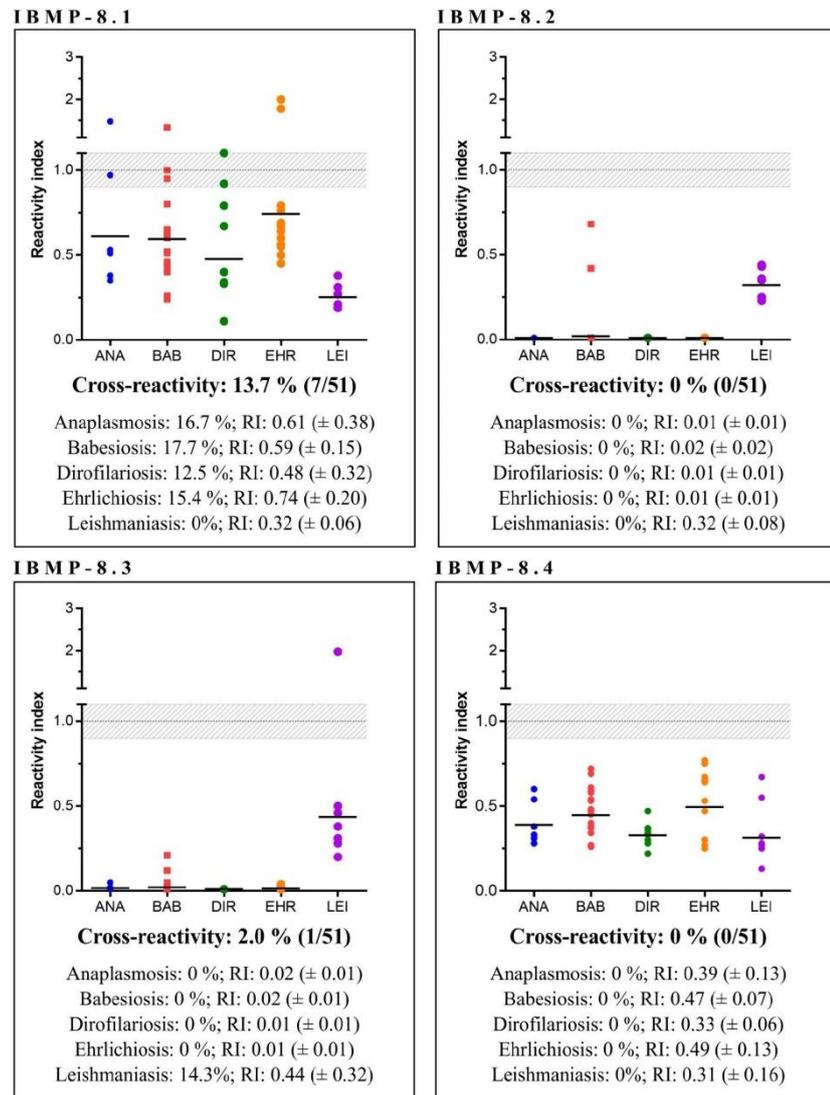


Fig 5. Analysis of IBMP chimeric antigens cross-reactivity with sera from dogs affected by unrelated parasites infection. The cut-off value is reactivity index = 1.0 and the shadowed area represents the grey zone (RI = 1.0 \pm 0.10). ANA (anaplasmosis); BAB (babesiosis); DIR (dirofilariosis); EHR (ehrlichiosis); LEI (leishmaniasis).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007545.g005>

specificity, and cross-reactivity with antibodies against *Leishmania* spp., amongst other trypanosomatids [16,17]. So, a strategy to address these limitations can be proposed by adopting synthetic recombinant chimeric antigens, composed of conserved amino acid sequences of several antigenic *T. cruzi* proteins [21,23,35,36]. To the best of our knowledge, this is the first study using recombinant chimeric proteins to diagnose *T. cruzi* infection in experimentally infected animals with known strains.

The diagnostic sensitivity was higher for IBMP-8.3 and IBMP-8.4 compared to the other chimeric proteins. Indeed, IBMP-8.3 correctly diagnosed all *T. cruzi* positive samples, regardless of the panel or strain, whereas IBMP-8.4 misidentified as negative only one positive sample from a dog infected with the Y strain. Conversely, IBMP-8.1 and IBMP-8.2 presented lower sensitivity values, probably due to their amino acid composition and the short period between inoculation and sampling (acute phase). We observed that the majority of false-negative results produced by IBMP-8.1 and IBMP-8.2 was associated with samples from panel 1. This panel was composed of dogs submitted to well-established infection protocols in which known strains were used. The sera sampling occurred two, six or 15 months postinfection. We observed that almost 50% of the false-negative results occurred in animals whose samples were collected two months postinfection. Thus, the quantity of specific IgG anti-*T. cruzi* antibodies did not appear sufficient to be detected by the IBMP-8.1 and IBMP-8.2 immunoassays performed here. Furthermore, the limited repertoire of antigenic epitopes in IBMP-8.1 and IBMP-8.2 compared to IBMP-8.3 and IBMP-8.4 could not be wide enough to identify the specific antibodies.

Considering the cross-reactivity assessment with sera from dogs carrying unrelated pathogens, the small number of samples that cross-reacted was statistically insignificant for the assays with IBMP-8.2, IBMP-8.3, and IBMP-8.4. IBMP-8.3 cross-reacted with one *Leishmania infantum*-positive serum, which was negative for other chimeric antigens. Conversely, IBMP-8.1 recognized at least one serum for anaplasmosis, babesiosis, dirofilariosis and ehrlichiosis as *T. cruzi*-positive samples, producing an overall cross-reaction rate of 13.7%. This was not expected owing to the low similarity of IBMP antigen sequences of *T. cruzi* to those deposited in the NCBI's Genbank for other species. Furthermore, cross-reacting samples also presented a low RI value. Inconclusive results using this panel were statistically insignificant, except to IBMP-8.1. These findings are similar to previous results obtained when our group assessed the cross-reactivity in human samples for pathogens of medical interest, such as dengue, B and C hepatitis, HIV, HTLV, visceral and cutaneous leishmaniasis, leptospirosis, rubella, measles, schistosomiasis, and syphilis using both ELISA and liquid microarray [19,20,26]. The low number of cross-reaction suggests that IBMP antigens, specially IBMP-8.3, can be safely used to diagnose canine *T. cruzi* infection in co-endemicity areas with other infectious parasites.

The main limitation of the study was the lack of a validated standard test to pre-classify the sera to be used to evaluate the efficiency of the antigens. To overcome this limitation we employed two in-house ELISAs as reference tests. So, the diagnostic performance of the present IBMP chimeric antigens could be biased due to shortcomings in the accuracy of the reference test. Another limitation was the number of samples with unrelated pathogens. Despite these restrictions, we conclude that IBMP-8.3 and IBMP-8.4 can be used for anti-*T. cruzi* IgG antibodies detection in dogs. These antigens could be potentially employed in a test to evaluate parasite's transmission cycle of *T. cruzi* in endemic settings and for veterinary purposes.

Supporting information

S1 Table. STARD checklist. Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy Studies (STARD) checklist for reporting of studies of diagnostic accuracy. (PDF)

S2 Table. Reactivity index for diagnostic performance assessment.

(PDF)

S3 Table. Reactivity index for cross-reactivity assessment.

(PDF)

Acknowledgments

We thank Dr. Kamila Gaudêncio da Silva Sales (Aggeu Magalhães Institute, Fiocruz-PE) for technical support. The authors acknowledge Tatiana R. S. Assunção for technical assistance and the Platform for Protein Purification and Characterization of the FIOCRUZ Technical Platform program for antigen purification. We also acknowledge Dr. Carlos Gustavo Régis da Silva (Gonçalo Moniz Institute, Fiocruz-BA) and Dr. Thessika Hialla Araujo (Bahiana School of Medicine and Public Health, Salvador-Brazil) for the critical review of the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Fred L. N. Santos.

Data curation: Fred L. N. Santos.

Formal analysis: Leonardo M. Leony, Natália E. M. Freitas, Fred L. N. Santos.

Funding acquisition: Mitermayer G. Reis, Deborah B. M. Fraga, Filipe Dantas-Torres, Fred L. N. Santos.

Investigation: Leonardo M. Leony, Natália E. M. Freitas, Rodrigo P. Del-Rei, Paola A. F. Celedon, Nilson I. T. Zanchin, Fred L. N. Santos.

Methodology: Leonardo M. Leony, Natália E. M. Freitas, Paola A. F. Celedon, Nilson I. T. Zanchin, Fred L. N. Santos.

Project administration: Fred L. N. Santos.

Resources: Claudia M. Carneiro, Alexandre B. Reis, Ana Maria Jansen, Samanta C. C. Xavier, Edmilson D. Silva, Deborah B. M. Fraga, Nilson I. T. Zanchin, Filipe Dantas-Torres, Fred L. N. Santos.

Supervision: Fred L. N. Santos.

Validation: Leonardo M. Leony, Natália E. M. Freitas, Rodrigo P. Del-Rei, Fred L. N. Santos.

Visualization: Fred L. N. Santos.

Writing – original draft: Leonardo M. Leony, Natália E. M. Freitas, Rodrigo P. Del-Rei, Fred L. N. Santos.

Writing – review & editing: Leonardo M. Leony, Claudia M. Carneiro, Alexandre B. Reis, Ana Maria Jansen, Samanta C. C. Xavier, Yara M. Gomes, Mitermayer G. Reis, Deborah B. M. Fraga, Nilson I. T. Zanchin, Filipe Dantas-Torres, Fred L. N. Santos.

References

1. Hotez PJ, Dumonteil E, Woc-Colburn L, Serpa JA, Bezek S, Edwards MS, et al. Chagas disease: "the new HIV/AIDS of the Americas". *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(5): e1498. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001498> Epub 2012 May 29. PMID: 22666504
2. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. 2010; 115(1–2): 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003> Epub 2009 Nov 20. PMID: 19932071.

3. Manne-Goehler J, Reich MR, Wirtz VJ. Access to care for Chagas disease in the United States: a health systems analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 2015; 93(1): 108–113. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0826> Epub 2015 May 18. PMID: 25986581.
4. Gürtler RE, Cardinal MV. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2015; 151: 32–50. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.029> Epub 2015 Jun 5. PMID: 26051910.
5. Gürtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE, et al. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology.* 2007; 134(Pt 1): 69–82. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001259> Epub 2006 Oct 11. PMID: 17032467.
6. Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res.* 40(2): 26. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009009> Epub 2009 Mar 3. PMID: 19250627.
7. Xavier SC, Roque AL, Lima Vdos S, Monteiro KJ, Otaviano JC, Ferreira da Silva LF, et al. Lower richness of small wild mammal species and chagas disease risk. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(5): e1647. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001647> Epub 2012 May 15. PMID: 22616021.
8. Luiz A, Roque R, Maria A. Importância dos animais domésticos sentinelas na identificação de áreas de risco de emergência de doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(Suppl III): 191–193. Portuguese.
9. Travi BL. Considering dogs as complementary targets of Chagas disease control. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2018; <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2325> Epub ahead of print. PMID: 30102585.
10. Caldas IS, Menezes APJ, Diniz LF, Nascimento ÁFSD, Novaes RD, Caldas S, et al. Parasitaemia and parasitic load are limited targets of the aetiological treatment to control the progression of cardiac fibrosis and chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. *Acta Trop.* 2018; 189: 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.015> Epub 2018 Oct 2. PMID: 30290285.
11. Santos FM, Mazzeti AL, Caldas S, Gonçalves KR, Lima WG, Torres RM, et al. Chagas cardiomyopathy: The potential effect of benznidazole treatment on diastolic dysfunction and cardiac damage in dogs chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2016; 161: 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.05.007> Epub 2016 May 20. PMID: 27215760.
12. Meyers AC, Meinders M, Hamer SA. Widespread *Trypanosoma cruzi* infection in government working dogs along the Texas-Mexico border: Discordant serology, parasite genotyping and associated vectors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(8): e0005819. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005819> eCollection 2017 Aug. PMID: 28787451.
13. Arce-Fonseca M, Carrillo-Sánchez SC, Molina-Barríos RM, Martínez-Cruz M, Cedillo-Cobián JR, Henao-Díaz YA, et al. Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in domestic dogs from Sonora, Mexico. *Infect Dis Poverty. Infectious Diseases of Poverty.* 2017; 6(1): 3–9.
14. Enriquez GF, Cardinal MV, Orozco MM, Schijman AG, Gürtler RE. Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. *Acta Trop.* 2013; 126(3): 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.03.001> Epub 2013 Mar 13. PMID: 23499860.
15. Cardinal MV, Sartor PA, Gaspe MS, Enriquez GF, Colaiani I, Gürtler RE. High levels of human infection with *Trypanosoma cruzi* associated with the domestic density of infected vectors and hosts in a rural area of northeastern Argentina. *Parasit Vectors.* 2018; 11(1): 492. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3069-0> PMID: 30165892.
16. de Oliveira Tda S, Barros JH, Perez TD, Figueiredo FB, Júnior AA, Madeira Mde F. Report of new cases of *Trypanosoma caninum* in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48(3): 347–349. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0307-2014> PMID: 26108017.
17. Médecins Sans Frontières. Campaign for Access to Essential Medicines. International meeting : new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(3): 315–319. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000300020> PMID: 18719818.
18. Santos FL, Celedon PA, Zanchin NI, Brasil Tde A, Foti L, Souza WV, et al. Performance assessment of four chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens based on antigen-antibody detection for diagnosis of chronic Chagas disease. *PLoS One.* 2016; 11(8): e0161100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161100> eCollection 2016. PMID: 27517281.
19. Santos FL, Celedon PA, Zanchin NI, de Souza WV, da Silva ED, Foti L, et al. Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic Chagas disease—a Phase II study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(3): e0005433. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005433> eCollection 2017 Mar. PMID: 28273127.
20. Santos FLN, Celedon PAF, Zanchin NIT, Leitolis A, Crestani S, Foti L, et al. Performance assessment of a *Trypanosoma cruzi* chimeric antigen in multiplex liquid microarray assays. *J Clin Microbiol.* 2017; 55(10): 2934–2945. <https://doi.org/10.1128/JCM.00851-17> Epub 2017 Jul 19. PMID: 28724556.

21. Peverengo LM, Garcia V, Rodeles LM, Mendicino D, Vicco M, Lagier C, et al. Development and assessment of an improved recombinant multiepitope antigen-based immunoassay to diagnose chronic Chagas disease. *Parasitology*. 2018; 1145(12): 1594–1599. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000458> Epub 2018 Mar 28. PMID: 29587896.
22. Granjon E, Dichtel-Danjoy M-L, Saba E, Sabino E, Campos de Oliveira L, Zrein M. Development of a novel multiplex immunoassay multi-cruzi for the serological confirmation of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(4): e0004596. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004596> eCollection 2016 Apr. PMID: 27035146.
23. Santos FLN, Campos ACP, Amorim LDAF, da Silva ED, Zanchin NIT, Celedon PAF, et al. Highly accurate chimeric proteins for the serological diagnosis of chronic Chagas disease: A latent class analysis. *Am J Trop Med Hyg*. 2018; 99(5):1174–1179. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0727> PMID: 30226130.
24. Dopico E, Del-Rei RP, Espinoza B, Ubillos I, Zanchin NIT, Sulleiro E, et al. Immune reactivity to *Trypanosoma cruzi* chimeric proteins for Chagas disease diagnosis in immigrants living in a non-endemic setting. *BMC Infect Dis*. 2019; 19(1):251. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3872-z> PMID: 30871504.
25. Del-Rei RP, Leony LM, Celedon PAF, Zanchin NIT, Reis MGD, Gomes YM, et al. Detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies by chimeric antigens in chronic Chagas disease-individuals from endemic South American countries. *PLoS One*. 2019; 14(4): e0215623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215623> eCollection 2019. PMID: 30998741.
26. Daltro RT, Leony LM, Freitas NEM, Silva AAO, Santos EF, Del-Rei RP, et al. Cross-reactivity using chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens: diagnostic performance in settings co-endemic for Chagas disease and American cutaneous or visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2019 Jun 12. pii: JCM.00762-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00762-19> PMID: 31189586.
27. Figueredo LA, Sales KGDS, Deuster K, Pollmeier M, Otranto D, Dantas-Torres F, et al. Exposure to vector-borne pathogens in privately owned dogs living in different socioeconomic settings in Brazil. *Vet Parasitol*. 2017; 243: 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.020> Epub 2017 May 22. PMID: 28807290.
28. Leite BMM, Solcà MDS, Santos LCS, Coelho LB, Amorim LDAF, Donato LE, et al. The mass use of deltamethrin collars to control and prevent canine visceral leishmaniasis: A field effectiveness study in a highly endemic area. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(5): e0006496. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006496> eCollection 2018 May. PMID: 29758031.
29. Campos MP, Madeira MF, Silva DA, Solcà MS, Espindola OM, Mendes Júnior AAV, et al. Accuracy of quantitative polymerase chain reaction in samples of frozen and paraffin-embedded healthy skin for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec*. 2017; 69: 1443–1450. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9053>
30. Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, et al. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*. 2007; 25(4): 7674–7686. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.009> Epub 2007 Aug 24. PMID: 17913311.
31. Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 1988; 240(4857): 1285–1293. <https://doi.org/10.1126/science.3287615> PMID: 3287615.
32. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33(1): 159–174. PMID: 843571.
33. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop*. 2018; 184: 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017> Epub 2017 Sep 21. PMID: 28941731.
34. WHO Expert Committee. Control of Chagas disease. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2002; 905:i-vi, 1–109, back cover. PMID: 12092045.
35. Camussone C, Gonzalez V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME, Lagier CM, et al. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16(6): 899–905. <https://doi.org/10.1128/CVI.00005-09> Epub 2009 Apr 1. PMID: 19339486.
36. Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, McNeill PD, Sleath PR, Lodes MJ, et al. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. *J Infect Dis*. 1999; 179(5): 1226–1234. <https://doi.org/10.1086/314723> PMID: 10191227.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEUA

Ministério da Saúde

FIOCRUZ**Fundação Oswaldo Cruz****Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**PROTOCOLO: **002/2017**PROJETO: "Avaliação e validação do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do *Trypanosoma cruzi*"

COORDENADOR: Dr. Fred Luciano Neves Santos

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 05/04/2017, e tem validade até 05/04/2019.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 04/05/2017, being valid until 04/05/2019.

SOLICITAMOS O ENVIO DOS RELATÓRIOS PARCIAL E FINAL NOS PRAZOS ESTABELECIDOS ABAIXO:

Vigência: **05/04/2017 a 05/04/2019.**Envio do Relatório Anual: **06/04/2018.**Relatório Final: **06/04/2019.**

Salvador, 06 de abril de 2017.

DEBORAH BITTENCOURT MOUTON FRAGACoordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ