

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DO *Trypanosoma cruzi* NO
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA EM CÃES:
UM ESTUDO DE FASE II**

NATÁLIA DANTAS FONTES

Salvador - Bahia

2022

CPqGM

NATALIA DANTAS FONTES

Avaliação de antígenos quiméricos do Trypanosoma cruzi no diagnóstico sorológico da doença de chagas crônica em cães: um estudo de fase II

2022

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DO *Trypanosoma cruzi* NO
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA EM CÃES:
UM ESTUDO DE FASE II**

NATÁLIA DANTAS FONTES

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

Orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos

Salvador - Bahia

2022

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

F683a Fontes, Natália Dantas.

Avaliação de antígenos quiméricos do *Trypanosoma cruzi* no diagnóstico sorológico da doença de chagas crônica em cães: um estudo de fase II / Natália Dantas Fontes. _ Salvador, 2022.

94 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

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

CDU 616.937

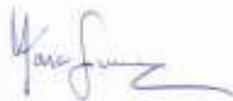
"AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DO *Trypanosoma cruzi* NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA EM CÃES - UM ESTUDO DE FASE II".

NATÁLIA DANTAS FONTES

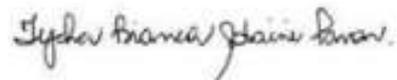
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 09 de março de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Yara de Miranda Gomes
Pesquisadora
FIOCRUZ/PE



Dra. Tycha Bianca Sabaini Pavan
Professora
UNICAMP



Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ/BA

FONTES DE FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz (IGM)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente à Deus, ao Senhor das nossas vidas e dos nossos propósitos, por me fortalecer dia após dia nessa caminhada e permitir a concretização de mais um sonho. Sem a permissão Dele nada disso seria possível, e por isso e por toda a proteção, eu o agradeço imensamente.

Ao meu orientador Dr. Fred Luciano Neves Santos, por acreditar em meu potencial e por possibilitar a execução deste projeto. O senhor esteve durante todo este tempo, ainda que em pandemia, sempre presente, solícito às dúvidas, dificuldades, assumindo não só um papel de orientador acadêmico, mas de inspiração profissional à todos nós do grupo. Levarei para a minha vida pessoal e profissional tudo aquilo que aprendi com o senhor.

À minha mãe, à quem eu dedico toda vitória em minha vida, por mais esta conquista. Muito obrigada pelo apoio incondicional, por sonhar os meus sonhos e pela total dedicação em me ver feliz e realizada. O seu amor é combustível em minha vida e sem ele nada faria sentido pra mim.

Ao meu noivo, João Victor, por todo apoio, amor e por estar sempre ao meu lado, em momentos bons e ruins. Obrigada pelas palavras de conforto, por vibrar em cada etapa realizada e por toda torcida. Sem a sua participação, tudo seria mais difícil. Aqui também estendo os agradecimentos à sua família, que desde sempre me acolheu tão bem e que também fazem parte desta conquista.

À todos os meus colegas do grupo de pesquisa, pelas mãos sempre estendidas dispostas a ajudar, por partilharmos durante esses dois anos uma rotina e por toda contribuição dada. Desejo a cada um de vocês muito sucesso e realizações.

Ao Instituto Gonçalo Moniz, pelo espaço disponibilizado, em especial ao Serviço de Microscopia Eletrônica (SME) e Dra. Adriana Lanfredi Rangel por ceder espaço do setor para execução dos experimentos.

Ao LASP, Laboratório Avançado de Saúde Pública, e todas as instituições parceiras, por viabilizar a realização da pesquisa.

À FAPESB, pelo financiamento e auxílio financeiro, durante todo o período de vigência do projeto.

FONTES, Natália Dantas. **Avaliação de antígenos quiméricos do *Trypanosoma cruzi* no diagnóstico sorológico da doença de Chagas Crônica em cães**: um estudo de fase II. 95 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os cães são considerados reservatórios de importância epidemiológica para a doença de Chagas devido ao seu papel de sentinela, proximidade com os seres humanos e manutenção do ciclo de transmissão em ambientes domésticos e peridomésticos. Além disso, destaca-se a correlação existente com a soroprevalência em humanos. Mesmo com o impacto epidemiológico, a ausência de testes diagnósticos para a detecção de cães infectados é um importante entrave que traz riscos à saúde pública. Uma estratégia para ultrapassar esta limitação baseia-se na utilização de antígenos recombinantes quiméricos do *Trypanosoma cruzi*. Nosso grupo, em um estudo de fase I, avaliou o potencial diagnóstico de quatro antígenos quiméricos e obteve resultados semelhantes aos encontrados em humanos. Desta forma, este estudo sucede ao de fase I, com um quantitativo amostral ampliado afim de avaliar os quatro antígenos quiméricos na detecção da infecção por *T. cruzi* por meio do ELISA indireto. **OBJETIVO:** Avaliar o desempenho diagnóstico dos antígenos recombinantes quiméricos do *T. cruzi* (IBMP-8.1, -8.2, -8.3 e -8.4) em imunoenaios para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em cães na forma crônica da doença de Chagas. **MATERIAL E MÉTODOS:** Os imunoenaios foram otimizados por *checkerboard titration*. Para o estudo de fase II foi avaliado o desempenho diagnóstico das IBMP a partir de 1.260 amostras séricas caninas provenientes de diferentes estados brasileiros. A reatividade cruzada para outras doenças infecto-parasitárias também foi avaliada em 752 amostras. Ao final, comparou-se o desempenho dos quatro antígenos com teste comercial humano adaptado à espécie canina. **RESULTADOS:** Os antígenos IBMP alcançaram valores de AUC que variaram entre 89,0-97,4%. O nível de exatidão variou de 87,8-96%. O maior índice de sensibilidade foi atribuído a IBMP-8.2 (90,3%), enquanto a IBMP-8.1, a IBMP-8.3 e a IBMP-8.4 obtiveram 74,8%, 72,6% e 79,6%, respectivamente. A maior especificidade encontrada foi para a IBMP-8.4 (99,6%), seguida pela IBMP-8.1 (90,6%), IBMP-8.2 (96,5%) e IBMP-8.3 (99,0%). A análise em série utilizando os pares de antígeno IBMP-8.1/IBMP-8.2 e IBMP-8.3/IBMP-8.4 proporcionaram valores de sensibilidade superiores a 97%. O teste comercial adaptado, o Gold Elisa Chagas, apresentou sensibilidade de 62,3%, especificidade de 98,6% e acurácia de 89,9%. O menor índice de reatividade cruzada foi alcançado com a IBMP-8.2 com 0,9%, sendo esta molécula a que mais se aproximou de um teste ideal. **CONCLUSÃO:** Devido ao bom desempenho das moléculas IBMP no diagnóstico da infecção por *T. cruzi* em cães, estas são promissoras para a identificação da doença de Chagas canina. A utilização combinada destes antígenos é uma alternativa que visa aumentar os valores de sensibilidade e especificidade em estudos futuros, bem como em outras plataformas diagnósticas.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Imunodiagnóstico. Antígenos recombinantes quiméricos. Cães.

FONTES, Natália Dantas. **Evaluation of chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens in serological diagnosis of chronic Chagas disease in dogs: a phase II study.** 95 f. il. Dissertation (Mestre em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa), Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Dogs are considered a reservoir of epidemiological importance for Chagas disease due to their sentinel role, proximity to humans, and maintenance of the transmission cycle in domestic and peridomestic settings. In addition, the existing correlation with seroprevalence in humans is highlighted. Despite the epidemiological importance, the lack of diagnostic tests to detect infected dogs is an important obstacle that threatens public health. A strategy to overcome this limitation is based on the use of chimeric recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens. Our group has investigated the diagnostic potential of four chimeric antigens in a phase I study and obtained results similar to those obtained in humans. Therefore, this study follows up the phase I study with an expanded sample size to evaluate the four chimeric antigens in detecting *T. cruzi* infection by indirect ELISA. **OBJECTIVE:** To evaluate the diagnostic performance of chimeric recombinant *T. cruzi* antigens (IBMP-8.1, -8.2, -8.3, and -8.4) in immunoassays for the detection of IgG anti-*T. cruzi* in dogs with the chronic form of Chagas disease. **MATERIALS AND METHODS:** Immunoassays were optimized by checkerboard titration. For phase II, the diagnostic performance of IBMPs was evaluated using 1,260 canine serum samples from different Brazilian states. Cross-reactivity with other infectious and parasitic diseases was also evaluated in 752 samples. Finally, the performance of the four antigens was compared with a commercial human test adapted to canine species. **RESULTS:** The IBMP antigens achieved AUC values ranging from 89.0-97.4%. Accuracy ranged from 87.8-96%. The highest sensitivity index was obtained for IBMP-8.2 (90.3%), while IBMP-8.1, IBMP-8.3 and IBMP-8.4 reached 74.8%, 72.6% and 79.6%, respectively. The highest specificity was found for IBMP-8.4 (99.6%), followed by IBMP-8.1 (90.6%), IBMP-8.2 (96.5%), and IBMP-8.3 (99.0%). Serial analysis with the antigen pairs IBMP-8.1/IBMP-8.2 and IBMP-8.3/IBMP-8.4 yielded sensitivity values of more than 97%. The commercially adapted test, the Gold Elisa Chagas, had a sensitivity of 62.3%, a specificity of 98.6%, and an accuracy of 89.9%. The lowest cross-reactivity index, 0.9%, was obtained with the IBMP-8.2, and this molecule was the closest to an ideal assay. **CONCLUSION:** Because of the good performance of IBMP molecules in diagnosing *T. cruzi* infection in dogs, they are promising for detecting Chagas disease in dogs. The combined use of these antigens is an alternative to increase sensitivity and specificity values in future studies as well as in other diagnostic platforms.

Keywords: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. Immunodiagnosis. Chimeric recombinant antigens. Dogs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - (A) Fotografia do cientista brasileiro Carlos Chagas; (B) Berenice, a primeira paciente com diagnóstico de doença de Chagas; (C) Recorte de um jornal brasileiro relatando a história da doença de Chagas e Berenice.....22
- Figura 2** - Desenho representativo da morfologia e formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*: amastigota, epimastigota e tripomastigota.....24
- Figura 3** - Desenho esquemático do ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e em triatomíneos.....25
- Figura 4** - Desenho esquemático representando o curso natural da infecção canina pelo *Trypanosoma cruzi*.....30
- Figura 5** - Desenho esquemático do esfregaço sanguíneo e exame de gota espessa para o diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda.....31
- Figura 6** - Desenho esquemático da técnica de hemaglutinação indireta para o diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica.....32
- Figura 7** - Desenho esquemático da técnica de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica.....33
- Figura 8** - Desenho esquemático da técnica imunoabsorção enzimática indireta (ELISA) para o diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica.....34
- Figura 9** - Rotas de migração de portadores crônica da doença de Chagas de países endêmicos da América Latina para países não endêmicos.....40
- Figura 10** - Desenho representativo da soroprevalência do *Trypanosoma cruzi* nas espécies canina e felina de acordo com diferentes regiões endêmicas situadas nas Américas.....42
- Figura 11** - SDS-PAGE dos antígenos IBMP corados pelo azul de Coomassie.....53
- Figura 12** - Distribuição binominal negativa para estimativa do número amostral para estudo da reatividade cruzada utilizando os antígenos IBMP.....54
- Figura 13** - Análise de classe latente (LCA) utilizada para caracterização do perfil sorológico do painel amostral inscrito no estudo.....56
- Figura 14** - Análise de classe latente (LCA) utilizada para caracterização do perfil sorológico do painel amostral inscrito no estudo59
- Figura 15** - Representação gráfica dos índices de reatividade dos antígenos IBMP no estudo de fase II (A), suas respectivas curvas ROC (B) e parâmetros de desempenho diagnóstico (C).....62

Figura 16 - Representação gráfica dos intervalos de confiança a 95% (IC95%) da AUC, sensibilidade, especificidade e acurácia, determinados para os antígenos IBMP.....	63
Figura 17 - Análise gráfica dos índices de reatividade das amostras de cães positivos para DC estratificadas por região geográfica utilizando os antígenos IBMP.....	65
Figura 18 - Análise gráfica da reatividade cruzada dos antígenos IBMP com soro de cães portadores de outras doenças.....	68
Figura 19 - Análise do desempenho diagnóstico do teste comercial Gold ELISA Chagas (REM Diagnóstica, Brasil) adaptado para diagnóstico da doença de Chagas em cães.....	70
Figura 20 - Classificação dos IBMP e do Gold Chagas ELISA quanto aos parâmetros de desempenho.....	71

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Fórmulas para obtenção da sensibilidade, especificidade e acurácia utilizando o esquema de análise em série e em paralelo.....49
- Tabela 2** - Probabilidades condicionais e prevalências das classes latentes segundo um modelo com 2 classes para biomarcadores de doença de Chagas55
- Tabela 3** - Painéis sorológicos utilizados na avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos IBMP.....57
- Tabela 4** - Análise do desempenho diagnóstico das proteínas quiméricas IBMP considerando as análises em série e em paralelo.....64
- Tabela 5** - Parâmetros de desempenho do IBMP estratificados por origem ou região geográfica na fase II do estudo.....66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acurácia
ANA	Anaplasrose
AUC	Área abaixo da curva (<i>Area under curve</i>)
BA	Bahia
BAB	Babesiose
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CLIA	Quimiluminescência indireta
DC	Doença de Chagas
DIR	Dirofilariose
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DO	Densidade óptica
DOR	Razão de possibilidades diagnóstica (<i>Diagnostic odds ratio</i>)
DTU	Unidade de tipagem discreta
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ERL	Erliquiose
Esp	Especificidade
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HAI	Hemaglutinação indireta
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
ICC	Instituto Carlos Chagas
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
IR	Índice de reatividade
ITP	Instituto de Tecnologia e Pesquisa
KDa	Kilodaltons

LASP	Laboratório Avançado de Saúde Pública
LB	Luria Bertani
LCA	Análise de classe latente (<i>Latent Class Analysis</i>)
LCS	Padrão de classe latente
LEI	Leishmaniose visceral
Leish	Leishmaniose
LFA	Imunoensaio de fluxo lateral (<i>Lateral Flow Assay</i>)
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
LR-	Verossimilhança negativa
LR+	Verossimilhança positiva
MA	Maranhão
MG	Minas Gerais
MM	Marcador de peso molecular
Neg	Negativo
N	Número de amostras
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pos	Positivo
PBS	Tampão fosfato-salina (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PE	Pernambuco
PI	Piauí
POS	Positivo
PP	Probabilidade à <i>posteriori</i>
PPoST-	Probabilidade pós teste negativa
PPoST+	Probabilidade pós teste positiva
PPreT	Probabilidade pré teste
RC	Reação cruzada
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SE	Sergipe
Sen	Sensibilidade
TMB	Tetra-metil-benzidina

UFOB	Universidade Federal do Oeste da Bahia
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte

LISTA DE SÍMBOLOS

Cm	Centímetros
°C	Graus Celsius
κ	Índice de <i>Kappa</i> de Cohen
\geq	Maior ou igual que
$>$	Maior que
\pm	Mais ou menos
\bar{X}	Média aritmética
$<$	Menor que
Mg	Micrograma
μ l	Microlitros
mA	Miliampere
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	21
2.2	BIOLOGIA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
2.3	VIAS DE TRANSMISSÃO.....	24
2.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	25
2.4.1	Doença de Chagas aguda	26
2.4.2	Doença de Chagas crônica	28
2.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	29
2.5.1	Na fase aguda	30
2.5.2	Na fase crônica	32
2.9	AS MOLÉCULAS IBMP.....	34
2.6	TRATAMENTO.....	36
2.7	PREVENÇÃO E CONTROLE.....	37
2.8	EPIDEMIOLOGIA.....	39
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	44
4.1.1	Locais de experimentação e procedimentos	44
4.1.2	Considerações éticas	44
4.2	OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES QUIMÉRICOS.....	45
4.2.1	Expressão e purificação	45
4.2.2	Determinação da concentração	45
4.2.3	Análise da integridade molecular dos antígenos através de SDS-PAGE	45
4.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	46
4.3.1	Dimensionamento amostral	46
4.3.2	Obtenção dos painéis sorológicos	46
4.3.3	Definição do padrão ouro e caracterização dos painéis sorológicos	47
4.3.4	Critérios de inclusão	47
4.3.5	Critérios de não inclusão	47
4.4	EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	48
4.4.1	Definição dos pontos de corte (CO – cut-off)	48
4.4.2	Normalização dos dados	48
4.4.3	Avaliação dos parâmetros de desempenho	48
4.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS IBMP.....	50
4.5.1	Estudo de fase II	50
4.5.2	Estudo de reatividade cruzada	51
4.5.3	Concordância de desempenho com teste comercial adaptado para cães	51

4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS	53
5.1	ANÁLISE DA INTEGRIDADE MOLECULAR DOS ANTÍGENOS ATRAVÉS DE SDS PAGE.....	53
5.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	53
5.2.1	Dimensionamento amostral	53
5.2.2	Definição padrão ouro	54
5.2.3	Obtenção dos painéis sorológicos	57
5.2.4	Caracterização do painel amostral	58
5.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS IBMP.....	60
5.3.1	Estudo de fase II	60
5.3.1.1	Desempenho global.....	60
5.3.1.2	Desempenho por área geográfica.....	64
5.3.2	Estudo de reatividade cruzada	67
5.3.3	Concordância de desempenho com kits comerciais adaptados	69
6	DISCUSSÃO	72
6.1	CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL.....	72
6.2	ESTUDO DE FASE II.....	73
6.3	ESTUDO DE REATIVIDADE CRUZADA.....	77
6.4	CONCORDÂNCIA COM TESTE COMERCIAL ADAPTADO PARA CÃES.....	77
7	CONCLUSÕES	79
8	PERSPECTIVAS	80
9	LIMITAÇÕES	81
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO	95

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é uma zoonose de importância mundial, que possui o *Trypanosoma cruzi* como agente etiológico, um protozoário hemoflagelado pertencente à classe Kinetoplastida. A DC concentra-se principalmente em 21 países da América Latina, sendo considerada uma das principais enfermidades infecto-parasitárias das Américas (OMS, 2019). Estima-se que existam 5-7 milhões de pessoas infectadas no mundo, bem como 70 milhões de indivíduos vivendo em áreas com risco de infecção (OMS, 2010). Por conta destes índices, a DC apresenta grande impacto na saúde pública.

O *T. cruzi* é transmitido principalmente a partir do contato com fezes e urina que contenham a forma tripomastigota metacíclica, quando o triatomíneo realiza o repasto sanguíneo. Porém, além da transmissão vetorial, os indivíduos podem se infectar a partir da via transfusional, congênita, oral, transplante de órgãos e, menos frequentemente, por meio de acidentes laboratoriais (SANTOS *et al.*, 2020). Em relação à espécie canina, as vias predominantes são a vetorial e oral, esta última devido ao hábito de caça e consequente ingestão de vetores parasitados (MONTENEGRO *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2009; SILVA-DOS-SANTOS *et al.*, 2017). Os triatomíneos, também conhecidos popularmente como barbeiros, chupões, bicudos e chupanças, pertencem a família Reduviidae, a qual possui cerca de 150 espécies com potencial vetorial (JARAMILLO *et al.*, 2000). Destas, mais de cinquenta foram identificadas no Brasil e relacionadas à infecção por *T. cruzi*, sobretudo as espécies *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*, *Rhodnius spp.* devido à participação da transmissão nos ciclos domésticos (ZINGALES, 2018).

Dentre as espécies domésticas de mamíferos reservatórios, os cães comportam-se como os principais hospedeiros e possuem um papel importante na manutenção do ciclo doméstico e peridoméstico da DC. De fato, a infecção destes animais representa um risco à saúde dos seres humanos, (GÜRTLER *et al.*, 2007). Infere-se que exista correlação entre a soropositividade para *T. cruzi* entre seres humanos e cães, dado que indivíduos adultos possuem uma elevação do risco de infecção em até 6 vezes, enquanto crianças que vivem em um mesmo ambiente que os cães soropositivos possuem 17 vezes maior risco de se infectarem (GÜRTLER *et al.*, 1998). A espécie canina possui elevada relevância epidemiológica na DC não apenas pelo fato do convívio próximo com os humanos, mas também por conta dos cães apresentarem elevada

suscetibilidade à infecção por *T. cruzi*, maior parasitemia, capacidade de atração dos vetores, alta força de infecção dos triatomíneos e também atuam como sentinela, sobretudo em regiões endêmicas (GURTLER *et al.*, 2007; ENRIQUEZ *et al.*, 2013; GURTLER; CARDINAL, 2015). Por conta da sua importância epidemiológica é fundamental que investigações soropidemiológicas sejam realizadas.

Desta forma, conhecer a soroprevalência dos cães, sobretudo em regiões endêmicas, consiste em uma ação relevante para elaboração de estratégias voltadas ao combate e controle da DC. Além da perspectiva de promoção da saúde pública, um diagnóstico preciso para a infecção por *T. cruzi* é fundamental na rotina clínica, pois estes animais desenvolvem sinais clínicos análogos aos observados em humanos e necessitam de acompanhamento veterinário (BARR, 2009). A partir da disponibilidade de uma plataforma diagnóstica com bom desempenho em clínicas, hospitais, consultórios e hemocentros veterinários é possível estabelecer uma conduta clínica assertiva, bem como um tratamento adequado, a fim de melhorar o prognóstico desta enfermidade e aumentar a qualidade de vida dos cães infectados.

Apesar da DC ter sido descoberta há mais de um século pelo cientista brasileiro Carlos Chagas, ainda há lacunas a serem elucidadas, sobretudo no diagnóstico dos indivíduos infectados. Um dos grandes entraves atuais é a ausência de testes sorológicos comerciais para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* na espécie canina, levando ao uso de testes *in-house* e com baixa reprodutibilidade no meio científico. Esta falta de disponibilidade predispõe a falhas diagnósticas, subnotificação, bem como atraso na confirmação de uma suspeita clínica.

O diagnóstico da DC difere de acordo com as fases da doença. Durante a fase aguda, métodos parasitológicos diretos e indiretos são preconizados, dentre eles pode-se optar por xenodiagnóstico, hemocultura e gota espessa (XAVIER *et al.*, 2012; ORTIZ *et al.*, 2015). Já na fase crônica, os testes sorológicos são os mais indicados devido a possibilidade de detectar anticorpos específicos IgG anti-*T. cruzi* circulantes. Nesta fase, as técnicas adotadas são a imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISA). Dentre eles, o método de ELISA destaca-se por possuir vantagens em sua execução, dado à possibilidade de automação, facilidade da técnica e baixo custo, bem como processamento de muitas amostras ao mesmo tempo (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). No entanto, o seu desempenho diagnóstico é condicionado às preparações antigênicas utilizadas neste imunoenensaio (DIAS *et al.*, 2016). A acurácia e capacidade de detecção dos anticorpos está sujeita também a grande variabilidade genética do *T. cruzi*, bem como a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, principalmente com espécies do gênero *Leishmania sp.* (VEGA

BENEDETTI *et al.*, 2013). Conforme mencionando anteriormente, o diagnóstico da DC canina na fase crônica é realizado por métodos *in house*, dada a ausência de testes comerciais para esta finalidade.

A utilização de antígenos recombinantes quiméricos em plataformas diagnósticas consiste em uma alternativa promissora para elevar o desempenho dos testes sorológicos na identificação da DC crônica. Esta premissa é sustentada pela capacidade destes antígenos aumentarem os valores de acurácia e também diminuírem ou anularem a ocorrência de reações cruzadas com outros patógenos, pois são constituídos por epítomos conservados e repetitivos de diversas proteínas do *T. cruzi*. Epítomos que compartilham similaridade com sequências proteicas de outras espécies podem ser removidos da molécula, reduzindo, desta maneira, a possibilidade de reatividade cruzada e resultados falso-positivos. Com isso em mente, nosso grupo desenhou e expressou quatro antígenos recombinantes quiméricos, denominados IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4, os quais tiveram os seus desempenhos diagnósticos avaliados para a identificação da DC em seres humanos (SANTOS *et al.*, 2016a; SANTOS *et al.*, 2017a; SANTOS *et al.*, 2017b) e, mais recentemente, em cães (LEONY *et al.*, 2019). Para os cães, a avaliação do potencial diagnóstico destas moléculas foi realizada por meio de um estudo de fase I, no qual foi demonstrado que as quatro moléculas exerceram alto poder discriminatório entre amostras positivas e negativas para a DC (LEONY *et al.*, 2019). Devido a estes resultados promissores, reafirma-se a necessidade de avanços no estudo com as moléculas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 em um estudo de fase II, no intuito de avaliar e desenvolver uma plataforma diagnóstica para o diagnóstico da DC crônica em cães, com elevada sensibilidade e especificidade, robustez e aplicabilidade tanto para o diagnóstico laboratorial quanto para utilização em inquéritos soroepidemiológicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) foi descrita pela primeira vez no ano de 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (1879-1934) (CHAGAS, 1909). No entanto, o processo de descoberta iniciou-se ainda em 1907 e possui um contexto histórico inusitado. Neste ano, o cientista Carlos Chagas (Figura 1A) havia sido designado a realizar pesquisas voltadas ao combate da malária, doença infecciosa que assolava os operários da construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, localizada no município de Lassance, região norte do estado de Minas Gerais.

Ao lado do seu colega de trabalho, Belizário Penna, o cientista improvisou um laboratório e consultório dentro de um vagão de trem e trabalhou arduamente para controle da epidemia. Certo dia, o engenheiro chefe da obra, Cantarino Motta, relatou à Carlos Chagas sobre um inseto hematófago encontrado na região, que atacava as pessoas, especialmente durante a noite, enquanto dormiam, e que estas desenvolviam alguns sintomas, até então desconhecidos. O cientista atentamente ouviu a descrição, interessou-se pelo assunto e, ao iniciar a investigação, descobriu que estes insetos se escondiam entre as frestas das casas de taipa e, por apresentarem um comportamento de picar a face dos indivíduos, eram popularmente chamados pelos habitantes locais de barbeiros (CHAGAS, 1909).

Após capturar alguns destes insetos, Chagas deu continuidade à sua investigação no laboratório e, ao dissecá-los, encontrou em glândula salivar e porção média do intestino formas protozoárias que no momento foram denominadas de *Schizotrypanum cruzi* e posteriormente, em homenagem a Oswaldo Cruz, o seu mentor, recebeu a nomenclatura atual de *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). A partir das pesquisas iniciais, o cientista constatou que este novo agente também era patogênico aos animais de laboratório e podiam ser encontrados em outras espécies.

Posteriormente, no dia 14 de abril de 1909, Chagas se deparou com a descoberta da nova doença em humanos ao examinar uma menina de dois anos de idade, Berenice, que apresentava a forma aguda da enfermidade (Figura 1B). Esta criança residia com a família em uma casa infestada com os “barbeiros” e, ao ser examinada pelo cientista, observou-se que apresentava sintomatologia clínica inespecífica, como: febre, linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia (KROPF; SÁ, 2009). No momento em que Carlos Chagas realizou a avaliação microscópica do

sangue da Berenice, observou as formas flageladas do *T. cruzi*, compatíveis com as que foram encontradas previamente nos barbeiros dissecados. A partir deste achado, Carlos Chagas descreveu o primeiro caso humano e toda a comunidade científica mundial recebeu o anúncio de uma nova enfermidade causada por tripanossomos (Figura 1C).

Tal feito exerceu grande impacto na história da medicina, já que Carlos Chagas foi capaz de identificar o parasita, perfil epidemiológico, ciclo evolutivo, vetor, reservatórios e a patogenia. Devido à enorme contribuição à ciência, Carlos Chagas teve reconhecimento internacional e recebeu o título de membro extraordinário da Academia de Medicina, além de premiações e consagrações. Além disso, depois da descoberta, o cientista assumiu papel importante durante todo trabalho realizado para desenvolvimento da saúde pública e o seu legado permitiu um notório avanço na medicina e, por esta razão, é considerado até os dias atuais um dos maiores cientistas da humanidade.



Figura 1- (A) Fotografia do cientista brasileiro Carlos Chagas; (B) Berenice, a primeira paciente com diagnóstico de doença de Chagas; (C) Recorte de um jornal brasileiro relatando a história da doença de Chagas e Berenice.

Fonte: KROPF, S; LACERDA, A., 2009; LIDANI *et al.*, 2019

2.2 BIOLOGIA DO *Trypanosoma cruzi*

A elucidação da biologia do agente etiológico da DC auxiliou na compreensão da patogênese e manifestações clínicas desenvolvidas por esta doença (ROCHITTE *et al.*, 2007; BONNEY; ENGMAN, 2008; DHIMAN *et al.*, 2008). O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado com ciclo de vida complexo e heteroxênico. Pertencente ao filo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (CAVALIER-SMITH, 1993; HONIGBERG, 1963; CAVALIER-SMITH, 2010; VITOR, 2012). O protozoário possui como característica a alta variabilidade

genética e tem a população composta por diversas cepas, além de diferir de acordo com morfologia, patogenicidade, fatores de virulência e susceptibilidade às drogas tripanossomicidas (ZINGALES, 2018).

O parasita apresenta uma membrana plasmática formada por uma bicamada lipídica que envolve diversas proteínas dispostas irregularmente e uma camada de microtúbulos (SOUZA, 2002). Além disso, a presença de glicopeptídeos associados ao ácido siálico conferem um importante fator na interação do agente com as células de defesa do hospedeiro, particularmente os macrófagos (MARTINEZ-DIAZ *et al.*, 2001). Quanto à morfologia, o protozoário possui o cinetoplasto, responsável por albergar DNA condensado. Em contraste, enquanto outras ordens de células eucarióticas possuem a capacidade de armazenar na mitocôndria apenas 1% do material genético, o *T. cruzi* mantém 16 a 30% do genoma no cinetoplasto (MOREIRA; LÓPEZ-GARCÍA; VICKERMAN, 2004). O material genético do cinetoplasto possui aproximadamente 5.000 a 20.000 microcírculos e 50 cópias de maxicírculos (SHAPIRO; ENGLUND, 1995). Já o flagelo é composto por nove microtúbulos e representa cerca de um terço do comprimento total, em que toda sua extensão é envolvida por uma membrana celular (CARRADA-BRAVO, 2004).

De acordo com as diferentes conformações que o *T. cruzi* assume (Figura 2), este pode ser classificado como: amastigota, epimastigota e tripomastigota. Estas formas diferem de acordo com o ciclo evolutivo e morfologia. As amastigotas representam a forma intracelular, encontradas em células de diversos tecidos do hospedeiro. Possuem a capacidade de evadir do sistema imune do hospedeiro e morfologicamente apresentam um tamanho de aproximadamente 1,5 a 4,0 μm de diâmetro, com formato esferoide e com núcleo e cinetoplasto sob forma de bastão. Além disso, o flagelo é diminuto e raramente visto em avaliação microscópica óptica (BARR, 2009; SOARES-SILVA *et al.*, 2016). As amastigotas do *T. cruzi* se multiplicam por meio de fissão binária a cada 12 horas até o momento que, devido à grande população, ocorre a ruptura celular e posteriormente a transformação em tripomastigota. As epimastigotas são encontradas no interior do trato digestivo do vetor e possuem elevada motilidade. Esta forma evolutiva apresenta flagelo e assume formato fusiforme, com o cinetoplasto localizado anteriormente ao núcleo (BARR, 2009). Já a tripomastigota representa a forma infecciosa do parasita, possuem formato mais alongado do que as epimastigotas e não apresentam potencial mitótico. As tripomastigotas podem ser encontrados na circulação sanguínea em hospedeiros vertebrados e invertebrados (REY, 2001).

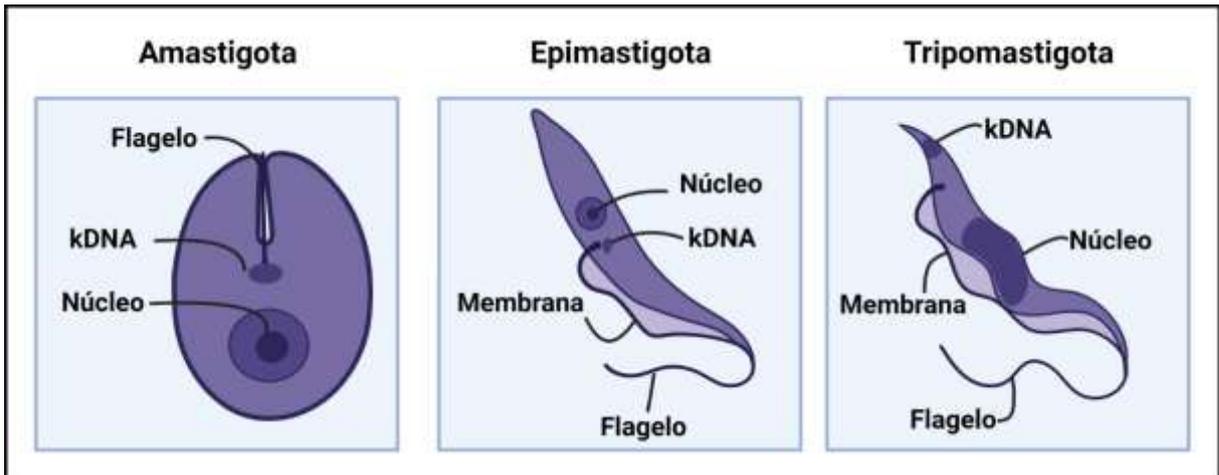


Figura 2 - Desenho representativo da morfologia e formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*: amastigota, epimastigota e tripomastigota.

Fonte: Grupo SerdYtech.

2.3 VIAS DE TRANSMISSÃO

Dentre as vias de transmissão existentes para a DC, a principal é a vetorial, que pode ter como vetores o *Triatoma infestans*, o *Rhodnius prolixus* e o *Triatoma dimidiata*. O *T. infestans* caracteriza-se como o principal vetor, no entanto a sua ocorrência varia de acordo com a localização geográfica. Na transmissão vetorial (Figura 3), no momento em que os triatomíneos realizam o repasto sanguíneo, os seres humanos, mamíferos silvestres e domésticos, inclusive os da espécie canina podem se infectar a partir do contato com as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes/urina do inseto (DUSCHAK; COUTO, 2009).

Além desta via, assim como ocorre nos humanos, é possível que os cães se infectem a partir da transfusão sanguínea e, conforme constatado em infecções experimentais, a ocorrência da transmissão vertical e transmamária (SCHMUNIS, 1999; BARR, 2009; RODRÍGUEZ-MORALEZ *et al.*, 2011). Somada a estas vias, a transmissão oral também pode ocorrer quando os animais ingerem triatomíneos infectados, devido ao hábito de caça ou prurido causado pela picada do triatomíneo (MONTENEGRO *et al.*, 2002).

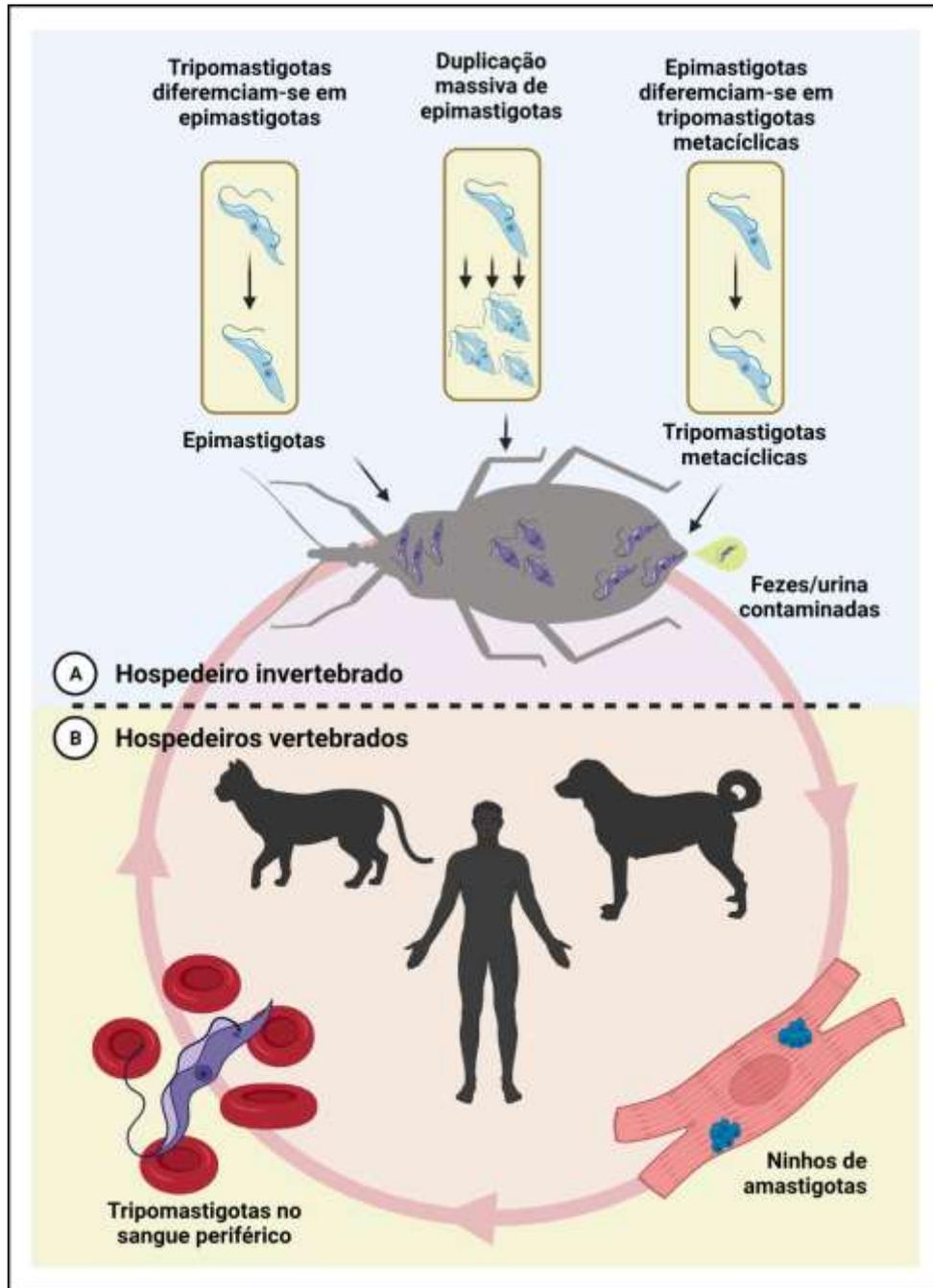


Figura 3 - Desenho esquemático do ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e em triatomíneos.

Fonte: Grupo SerdYtech.

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A DC é subdividida em duas fases distintas: aguda e crônica. De acordo a esta classificação, indivíduos infectados com *T. cruzi* podem apresentar sinais clínicos variados. A fase aguda ocorre logo após a infecção, entre os primeiros dias após a exposição ao agente etiológico, variando entre 4 a 15 dias (DIAS *et al.*, 2016). Neste momento, ocorre uma alta

parasitemia, e em contrapartida, uma baixa titulação de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. Nesta fase, muitas vezes os indivíduos infectados são assintomáticos ou desenvolvem sinais e sintomas clínicos brandos e inespecíficos (BERN *et al.*, 2019). Em média, 90 dias após a exposição, o nível de parasitemia decai, os títulos de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* aumentam e, em seguida, instala-se a fase crônica da doença (DIAS *et al.*, 1956; PINTO *et al.*, 2009).

A fase crônica da DC pode ser classificada como indeterminada, na qual os portadores não apresentam sinais clínicos ou qualquer sintomatologia ao longo de sua vida, ou como sintomática, na qual 30-40% dos portadores crônicos apresentam acometimento cardíaco e/ou digestivo insidiosos (VIOTTI *et al.*, 2004). Ao contrário da fase aguda, os indivíduos infectados que evoluem para a fase crônica, apresentam aumento na titulação de anticorpos anti-*T. cruzi* e possível acometimento sistêmico, sobretudo do sistema cardiovascular, digestório e neurológico. Em particular, a espécie canina pode partilhar de sinais clínicos semelhantes aos já descritos em humanos e, por este motivo, os cães são considerados modelos experimentais para o estudo da DC (ANDRADE, 1984; TAFURI *et al.*, 1988). Apesar destes animais desenvolverem sinais clínicos análogos aos humanos, incluindo formas mais graves devido à maior parasitemia (ENRIQUEZ *et al.*, 2014), ainda existem divergências e escassez de descrições, sobretudo pelo fato que a maior parte dos estudos científicos voltados a esta espécie foram baseados em infecções experimentais ou a partir da avaliação das alterações *post mortem* (CAMACHO; ALVES, 2007). Por este motivo, ainda há lacunas e necessidade de novos estudos que tenham a finalidade de caracterizar os aspectos clínicos desenvolvidos pelos cães, principalmente a partir das infecções naturais por *T. cruzi* (BLANDON *et al.*, 1995; MONTENEGRO *et al.*, 2002).

2.4.1 Doença de Chagas aguda

Os seres humanos infectados por *T. cruzi* durante a fase aguda podem apresentar sintomatologia clínica ampla e diversa, que varia desde sintomas brandos e inespecíficos a casos mais graves com evolução para miocardite, meningoencefalite e morte súbita (SIMÕES *et al.*, 2018). Os sinais clínicos podem iniciar 1-2 semanas pós-exposição ao agente etiológico. Os sinais mais usualmente relatados são: febre intermitente, hepatoesplenomegalia, linfonomegalia, mal-estar, apatia e diarreia (ARGOLO *et al.*, 2008). Outros sinais também evidenciados com frequência são a intolerância a exercícios e esforços físicos, dispneia, edema de membros inferiores, mialgias, artralgias e *rash* cutâneo (CRESCENTE *et al.*, 1992;

CRESCENTE *et al.*, 1994; SILVEIRA, 1997; VALENTE *et al.*, 1997). Em alguns casos também podem ser encontradas alterações compatíveis com a porta de entrada da transmissão vetorial do *T. cruzi*, representadas por edema subcutâneo ou da conjuntiva, denominado como chagoma de inoculação e sinal de Romaña, respectivamente (DIAS *et al.*, 1956).

Assim como o descrito em humanos, a DC aguda provoca na espécie canina sinais clínicos inespecíficos, tais como febre discreta, diarreia, êmese, perda de peso, anorexia, organomegalia, linfonomegalia, ascite, angústia respiratória, paraplegia e, em casos mais graves, pode desencadear a morte súbita (LANA; CHIARI; TAFURI, 1992; CAMACHO *et al.*, 2007). Esta fase pode ser observada em cães de qualquer idade, incluindo os mais jovens e filhotes, com idade variável entre cinco dias a seis meses (CAMACHO *et al.*, 2007), sendo estes também os mais predispostos a manifestar sinais clínicos graves. Infere-se que cães com idade inferior a 1 ano representam quase a metade dos animais que evoluem para morte súbita em decorrência da fase aguda da DC (KJOS *et al.*, 2008). Em infecções experimentais, foi observado que cães infectados por via ocular também podem desenvolver alterações semelhantes ao sinal de Romaña, com edema palpebral e lacrimejamento (LANA; CHIARI; TAFURI, 1992).

Quanto as implicações no sistema cardiovascular dos cães, são descritas bradicardia, arritmias, miocardite que se inicia em átrio e estende-se comprometendo ventrículo direito, alterações eletrocardiográficas, como bloqueio atrioventricular, inversão da onda T e alterações em segmento ST (WILLIAMS *et al.*, 1977; ANDRADE *et al.*, 1994; VITT *et al.*, 2016). Em infecções experimentais via transplacentária, foi observado que o *T. cruzi* causa um processo inflamatório na placenta, bem como pode estar presente em células trofoblásticas. Ainda no ambiente intrauterino, os fetos infectados por *T. cruzi* apresentam crescimento retardado, hepatoesplenomegalia, comprometimento do sistema nervoso e cardiovascular e defeitos teratogênicos. A infecção também pode ocasionar patologias do parto, como aborto, prematuridade e natimortos (RIBEIRO *et al.*, 1988, MORENO *et al.*, 2003, TORRICO *et al.*, 2006, BURGOS *et al.*, 2009, RODRIGUEZ- MORALES *et al.*, 2011).

2.4.2 Doença de chagas crônica

Após a fase aguda, os cães, assim como os seres humanos, podem não apresentar progressão da DC por conta do estabelecimento de equilíbrio na relação parasita-hospedeiro. Em humanos, estima-se que 30-40% dos portadores crônicos desenvolvam sintomatologia relacionada à fase crônica (OMS, 2010). Todavia, o quantitativo de animais que desenvolve sintomatologia é desconhecido. A fase crônica caracteriza-se pela baixa parasitemia e pela produção dos anticorpos IgG anti-*T. cruzi* (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Ao início da fase crônica os cães podem ser assintomáticos e não apresentarem quaisquer alterações nos exames complementares (BARR *et al.*, 1991). Contudo, 8 a 36 meses pós-infecção os animais são acometidos com disfunções cardiovasculares, especialmente cardiopatias associadas a miocardite e cardiomegalia (BARR *et al.*, 1991; BARR; GOSSETT; KLEI, 1991). Além destes sintomas, os animais infectados usualmente apresentam ascite, efusão pleural, hipotensão, congestão da veia jugular e hepatomegalia (BARR *et al.*, 1991). Os cães quando infectados podem apresentar alterações cardíacas variáveis, dentre elas arritmias ventriculares, bloqueio atrioventricular, elevação dos níveis de troponina e aumento do ventrículo direito, sendo este último um achado relacionado com um pior prognóstico e diminuição do tempo de sobrevivência do animal (MATTHEWS *et al.*, 2021).

O ecocardiograma apresenta alterações relacionadas a cardiomiopatia, desde dilatação do ventrículo direito, remodelamento cardíaco, menor ejeção do volume sanguíneo, redução do débito cardíaco até disfunção do ventrículo esquerdo (ANDRADE *et al.*, 1994; ANDRADE *et al.*, 1997; COURA, 2003). Adicionalmente, são encontradas áreas multifocais de fibrose, achado que induz a dilatação cardíaca de forma compensatória (TANOWITZ *et al.*, 1992; ANDRADE *et al.*, 1994). Em cortes histológicos também podem ser observados infiltrados celulares, perivasculite, fibrose multifocal e, em condições mais raras, são encontrados pseudocistos (BARR *et al.*, 1991; ANDRADE *et al.*, 1994).

A patogênese das lesões do sistema digestivo de cães infectados ainda não está totalmente esclarecida. Contudo, infecções experimentais utilizando a cepa Be-78 demonstraram áreas de fibrose em esôfago e cólon, além de denervação mioentérica (NOGUEIRA-PAIVA *et al.*, 2014). Investigou-se também as implicações da fase crônica no exame andrológico de cães infectados experimentalmente com *T. cruzi*, porém não foram encontradas alterações na qualidade seminal bem como na circunferência escrotal destes indivíduos (RODRÍGUEZ-MORALES *et al.*, 2014).

2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Apesar da DC ter sido descoberta há mais de um século e ser considerada uma das mais importantes endemias do Brasil e Américas, em que milhares de pessoas são infectadas ou vivem sob o risco de infecção, ainda há grandes desafios nos dias atuais para o seu combate, principalmente no que diz respeito ao diagnóstico e tratamento (MONCAYO, 1999). O diagnóstico da DC é realizado por testes laboratoriais, além da avaliação clínica e do histórico epidemiológico do indivíduo. Todavia, diversos fatores devem ser considerados para que o diagnóstico laboratorial seja exitoso, tais como o nível de parasitemia, a metodologia escolhida, possibilidade de reações cruzadas, dentre outros. Portanto, os achados laboratoriais devem sempre ser associados às evidências epidemiológicas e ao quadro clínico do paciente, a fim de aumentar o nível de predição e acurácia do diagnóstico (DIAS *et al.*, 2016). A Figura 4 ilustra a história natural da infecção canina causada pelo *T. cruzi* e as estratégias diagnósticas que devem ser utilizadas em cada fase da infecção.

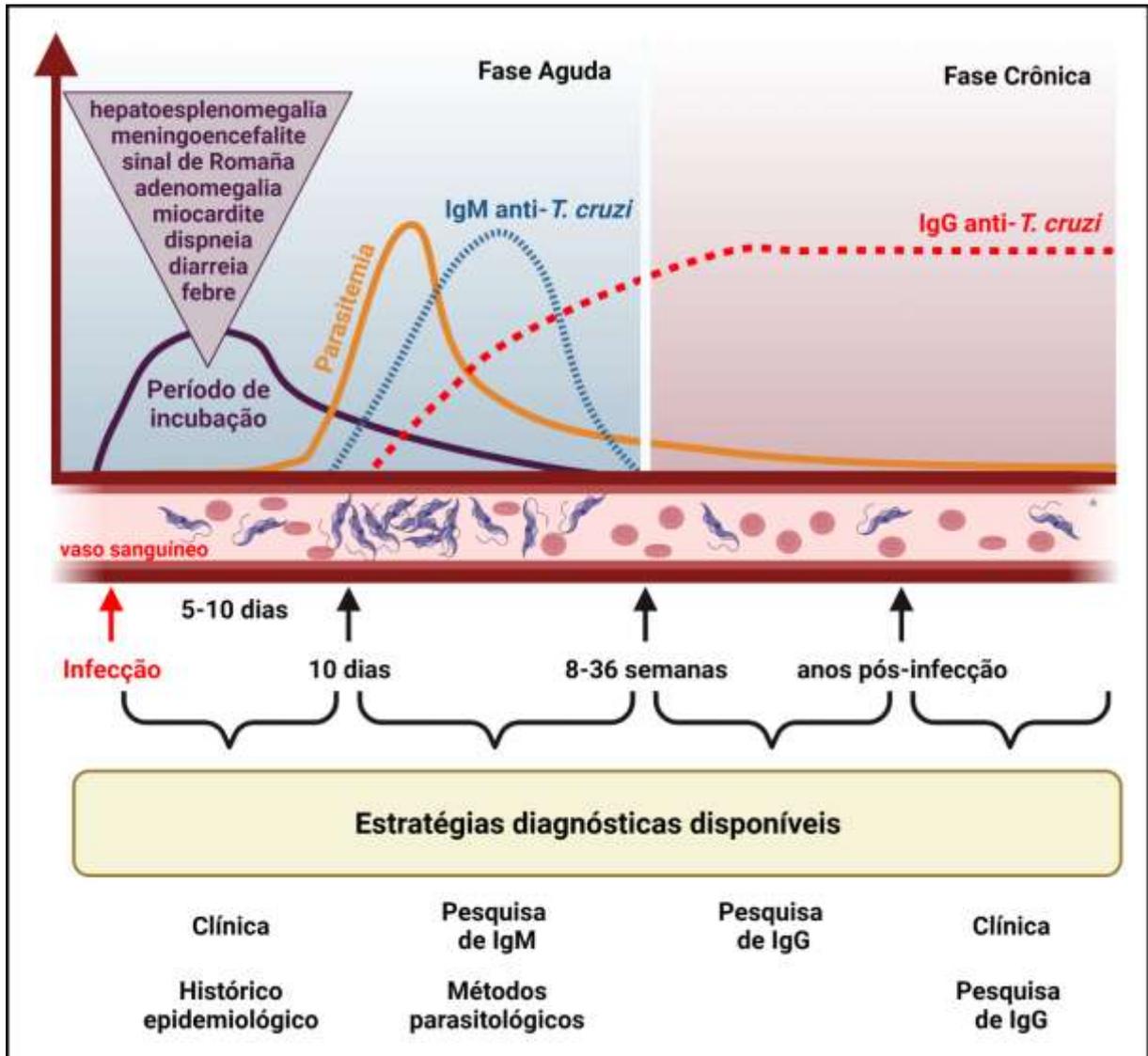


Figura 4 - Desenho esquemático representando o curso natural da infecção canina pelo *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Grupo SerdYtech.

2.5.1 Na fase aguda

A escolha da metodologia a ser empregada para o diagnóstico laboratorial da DC nesta fase deverá levar em consideração o tempo de infecção. Os métodos parasitológicos, ou seja, aqueles que permitem realizar a observação direta ou indireta do parasita, são os mais adotados. De forma geral, o resultado será positivo a partir da visualização dos parasitas sob a forma de tripomastigota em circulação periférica do indivíduo infectado (Figura 5), em que este achado é considerado como padrão-ouro.

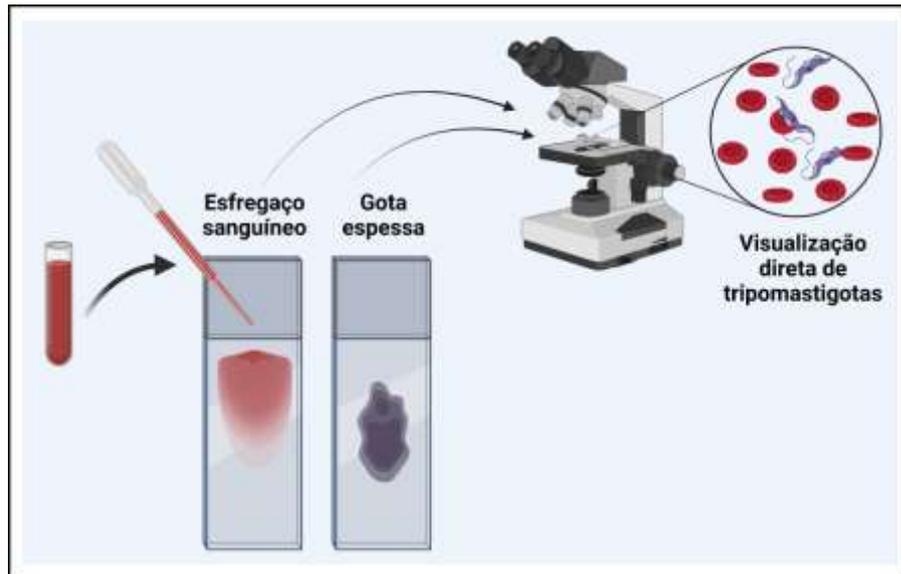


Figura 5 - Desenho esquemático do esfregaço sanguíneo e exame de gota espessa para o diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda.

Fonte: Grupo SerdYtech.

Uma das possibilidades diagnósticas nesta fase é a gota espessa, exame parasitológico direto realizado a partir da coleta sanguínea por punção venosa para posterior confecção de lâminas, observação e identificação do agente etiológico em microscópio. Já o xenodiagnóstico caracteriza-se como um método indireto e fundamenta-se na investigação a partir da infecção experimental de um vetor após a realização de repasto sanguíneo em um indivíduo com suspeita clínica de infecção. Estes vetores são mantidos sob ambiente com controle de temperatura, umidade e luminosidade e podem ser utilizados para detecção em humanos e outras espécies. Contudo, devido a necessidade de equipe técnica qualificada, custos com instalações específicas e manutenção dos vetores, o xenodiagnóstico tem perdido aplicabilidade (ORTIZ *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2018). A hemocultura é outra possibilidade diagnóstica e consiste no cultivo do sangue do paciente com suspeita de infecção, a fim de que o *T. cruzi* se multiplique até o momento de poder ser visualizado sob observação microscópica. Uma grande variedade de meios de cultura pode ser utilizada, como a base de ágar sangue, LIT (*liver infusion tryptose*), BHI (*brain heart infusion*) e Warens. No entanto, devido à baixa sensibilidade, morosidade do cultivo e execução laboriosa, assim como o xenodiagnóstico, tem caído em desuso (XAVIER *et al.*, 2012; ORTIZ *et al.*, 2015).

Os testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são capazes de identificar a presença do material genético do agente etiológico em amostras biológicas do indivíduo infectado (AVILA *et al.*, 1993). Esta técnica é utilizada como alternativa para diagnóstico da DC, porém o seu desempenho é variável. Apesar das técnicas moleculares

apresentarem elevada especificidade nas fases aguda e crônica, a sua sensibilidade é condicionada ao grau de parasitemia. Portanto, na fase crônica, em que a parasitemia é geralmente subpatente, as técnicas moleculares são desaconselhadas (BRASIL *et al.*, 2010).

2.5.2 Na fase crônica

Durante a fase crônica, dentre as possibilidades diagnósticas, os métodos sorológicos indiretos são os mais indicados, já que neste período ocorre a baixa parasitemia e é possível detectar a presença de anticorpos anti-*T. cruzi*. Para os seres humanos, um indivíduo é considerado infectado quando anticorpos IgG anti-*T. cruzi* são detectados por dois métodos sorológicos distintos (OMS, 2012;2013). No Brasil, o diagnóstico pode ser realizado por dois testes de mesmo princípio metodológico que utilizem preparações antigênicas distintas (DIAS *et al.*, 2016). De forma geral, podem ser empregados a hemaglutinação indireta (HAI), a imunofluorescência indireta (IFI), a quimiluminescência indireta (CLIA) e o método imunoenzimático (ELISA). A HAI baseia-se na formação de agregados, como resultado da interação de anticorpos específicos e antígenos sensibilizados na superfície de eritrócitos (Figura 6). Um resultado é considerado positivo quando os eritrócitos se aglutinam e formam uma camada no fundo do poço da placa. Quando não há anticorpos específicos, ou seja, um resultado negativo, os eritrócitos formam um “botão” no fundo do poço. Apesar da facilidade de execução, grande praticidade e não demandar alto custo, possui a desvantagem de avaliar as amostras apenas de forma qualitativa ou semiquantitativa, além de altos índices de resultados falso-positivos e falso-negativos (GADELHA *et al.*, 2003).

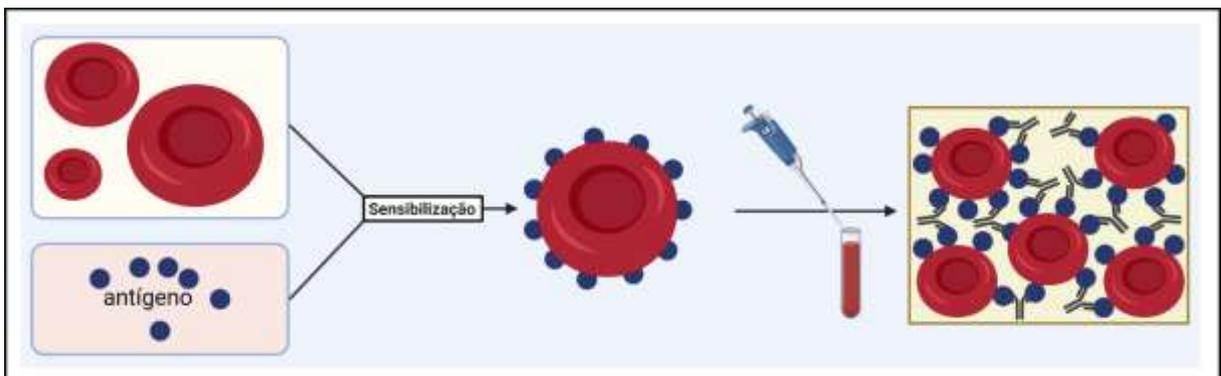


Figura 6 - Desenho esquemático da técnica de hemaglutinação indireta para o diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica.

Fonte: Grupo SerdYtech.

Diferente da HAI, a IFI é uma técnica que detecta a interação do antígeno e anticorpos específicos a partir da marcação com fluoróforos, de modo que esta ligação torna-se visível ao microscópio de fluorescência (Figura 7). Ainda que tenha aplicação para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas, esta metodologia apresenta limitações devido a subjetividade na leitura, impossibilidade de automação, baixa especificidade, possibilidade de reatividade cruzada com espécies do gênero *Leishmania* sp. e necessidade de equipe bem treinada. Por estas razões, este método não é mais utilizado na rotina laboratorial e está gradativamente sendo substituído por outras metodologias, dentre elas os ensaios imunoenzimáticos.

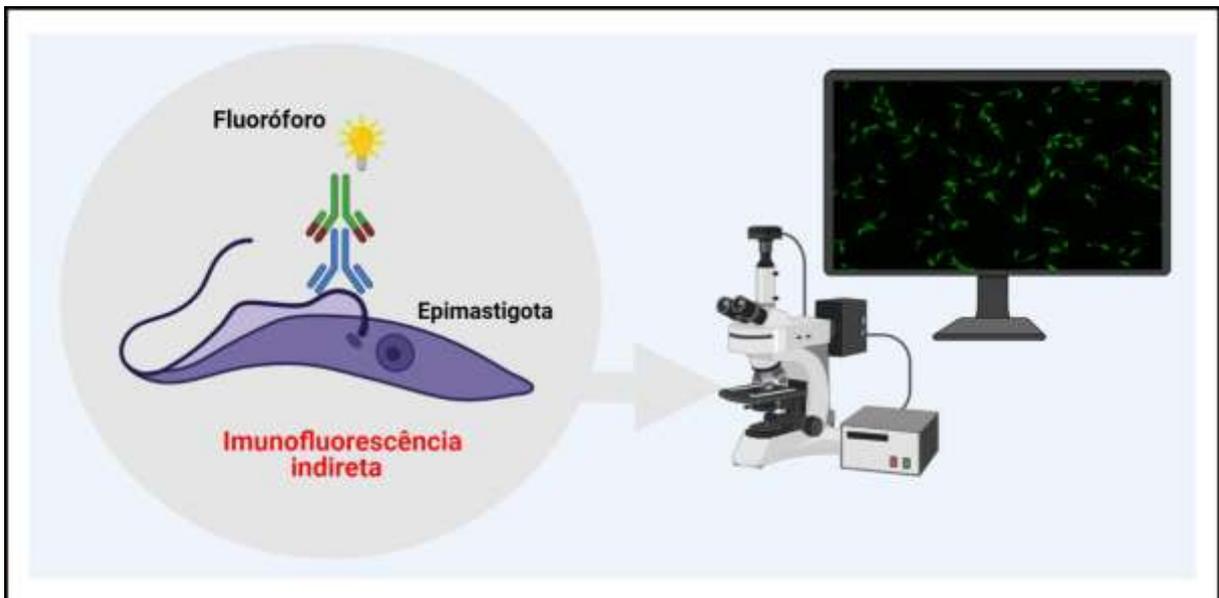


Figura 7 - Desenho esquemático da técnica de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica.

Fonte: Grupo SerdYtech.

O método ELISA é utilizado para detectar a presença de anticorpos em uma amostra investigada. É um teste quantitativo realizado em uma placa de poliestireno com 96 poços, na qual os antígenos e anticorpos se unem a partir de ligações hidrofóbicas (Figura 8). Na ocasião desta interação, um segundo anticorpo, conjugado à uma enzima, é adicionado, o qual é dirigido contra a porção cristalizável do anticorpo primário. A partir da reação da enzima com o substrato, ocorre uma oxidação do cromógeno, que irá ressaltar a coloração a depender da titulação de anticorpos presentes na amostra biológica. Para determinar quais amostras são positivas ou negativas, deve-se calcular um ponto de corte; valores acima deste ponto de corte são considerados positivos e abaixo, negativos. Em detrimento das demais técnicas, o ELISA

possui como vantagens alta sensibilidade e especificidade, permite que várias amostras sejam testadas simultaneamente, além de ter uma execução essencialmente simples, com baixo custo e rápida. Contudo, o seu desempenho é dependente do antígeno empregado em sua preparação (ROSÁRIO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2016a).

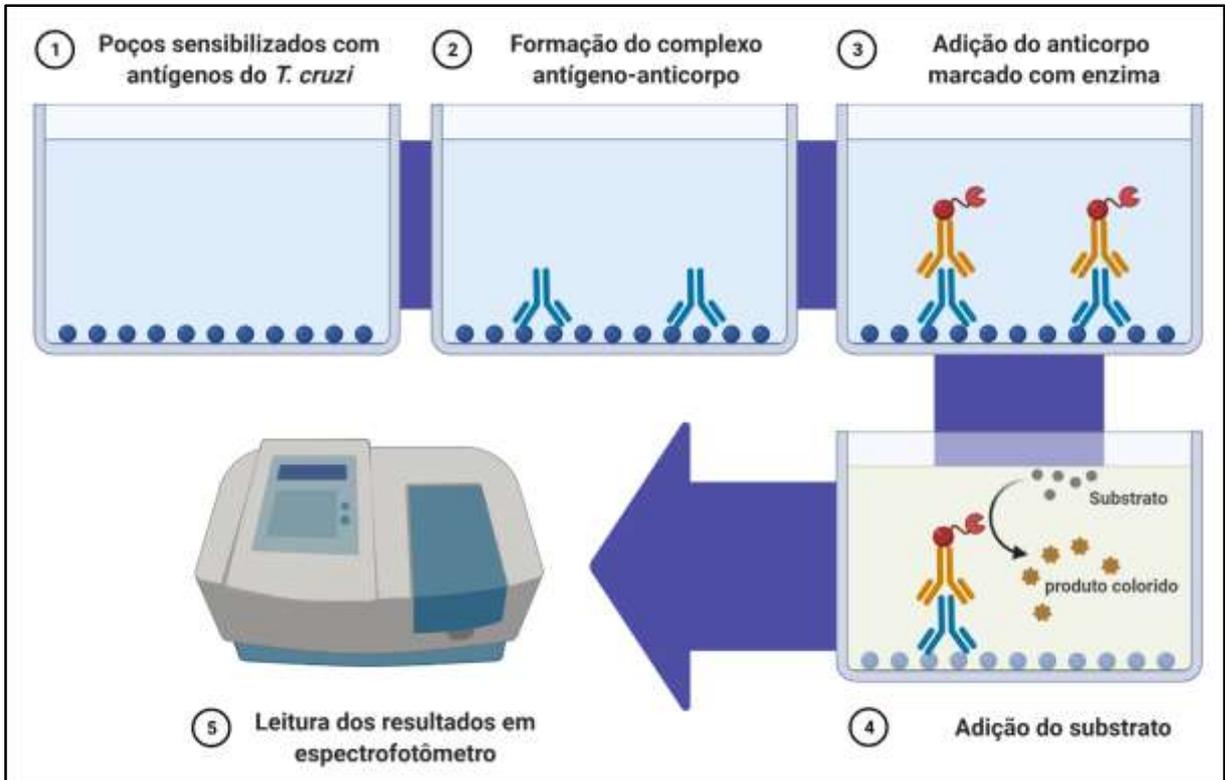


Figura 8 - Desenho esquemático da técnica imunoadsorção enzimática indireta (ELISA) para o diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica.

Fonte: Grupo SerdYtech.

2.9 AS MOLÉCULAS IBMP

Os antígenos recombinantes quiméricos utilizados no presente estudo foram produzidos por técnicas de engenharia genética com a finalidade de melhorar o desempenho do imunodiagnóstico da infecção causada pelo *T. cruzi*. Estas moléculas, intituladas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4, são formadas por sequências conservadas e repetitivas de diferentes proteínas do parasita, obtidas em distintas porções deste protozoário (SANTOS *et al.*, 2016b). O potencial diagnóstico destas moléculas, para identificação da DC em humanos, foi explorado em diversos estudos utilizando diferentes plataformas diagnósticas. Inicialmente, foi realizada uma prova de conceito (ou estudo de fase I), que objetivou avaliar a sua capacidade em discriminar amostras positivas e negativas para DC. Para esta finalidade, um total de 280

amostras positivas e 20 negativas foram utilizadas e observou-se que todas elas foram capazes de diferenciar os grupos de maneira significativa (SANTOS *et al.*, 2016a). Tendo em vista os resultados alcançados, as moléculas foram eleitas para participar do estudo de fase II, cujo objetivo é a determinação dos parâmetros de desempenho de um teste diagnóstico, a saber: sensibilidade, especificidade, acurácia, dentre outros. Neste tipo de avaliação, o quantitativo amostral deve ser determinado estatisticamente e a população de estudo deve representar o agravo em questão, ou seja, amostras positivas de indivíduos com diferentes apresentações clínicas da doença e amostras positivas e negativas de indivíduos provenientes tanto de áreas endêmicas quanto não endêmicas.

As avaliações que compuseram o estudo de fase II demonstraram valores elevados de sensibilidade e especificidades para quatro moléculas (SANTOS *et al.*, 2017a, SANTOS *et al.*, 2017b, SANTOS *et al.*, 2018, DOPICO *et al.*, 2019, DEL-REI *et al.*, 2019; DALTRO *et al.*, 2019). Estes valores foram superiores aos de testes comerciais disponíveis no mercado brasileiro (SANTOS *et al.*, 2017a). Mais recentemente, os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 foram selecionados para compor um estudo de fase I através da plataforma de imunoenensaio de fluxo lateral (LFA, *lateral flow assay*), utilizando amostras representativas de diferentes formas clínicas da DC e de diferentes áreas endêmicas do Brasil, sendo observada alta capacidade diagnóstica e aplicabilidade do LFA em atendimentos *point-of-care* (SILVA *et al.*, 2020). Em 02 de julho de 2020, através da Resolução-RE N° 2.281 do Ministério da Saúde, a Fundação Oswaldo Cruz recebeu aprovação do registro e na licença de produção do TR-Chagas Bio-Manguinhos para produção do LFA empregando os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4, para utilização no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2020).

Tendo em vista os resultados obtidos com soros de humanos, o papel do cão na manutenção do ciclo da DC e a falta de testes sorológicos comerciais para a identificação da doença nestes animais, os antígenos IBMP também foram submetidos a uma avaliação para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em soros de cães (estudo de fase I), sendo observado que as quatro moléculas apresentam alta capacidade diagnóstica (LEONY *et al.*, 2019). Neste estudo, foram utilizadas amostras séricas de cães experimentalmente e naturalmente infectados oriundos de diferentes áreas endêmicas e não endêmicas do Brasil. Para avaliação de reatividade cruzada, foram empregadas amostras positivas para outras doenças infecto-parasitárias, tais como: babesiose, erliquiose, anaplasmose, dirofilariose e leishmaniose visceral. Os resultados foram animadores e demonstraram que os quatro antígenos quiméricos exerceram alto poder discriminatório, atingindo elevados níveis de sensibilidade e especificidade, com destaque para

os antígenos IBMP-8.3 e IBMP-8.4. Os resultados obtidos nos motivaram a realizar o presente estudo, uma avaliação de fase II para a DC canina que visa não apenas o impacto na melhoria da investigação epidemiológica dos programas de saúde pública, mas também no incremento da assistência veterinária através do desenvolvimento de um teste eficaz e legítimo para esta espécie.

2.6 TRATAMENTO

O tratamento da DC ainda é um desafio para a ciência, fato que cria um estigma de doença incurável. Em termos gerais, o tratamento tem por objetivo conter a infecção e prevenir o surgimento de lesões em tecidos (DIAS; COURA, 1997). Apesar da grande evolução dos estudos voltados à terapêutica, ainda existem obstáculos para um tratamento eficaz, amplamente distribuído à população e que proporcione um bom prognóstico e qualidade de vida aos portadores da infecção.

Diversas drogas já foram testadas como possibilidade de tratamento para a DC, como o arsênico, tintura fucsina, tártaro emético e cloreto de mercúrio. Contudo, todas apresentaram resultados insatisfatórios (CROFT, 1999; COURA; CASTRO, 2002). Agentes quimioterápicos também foram avaliados e introduzidos nos protocolos terapêuticos, porém também foram ineficazes. Anos mais tarde, os fármacos da classe dos nitrofuranos passaram a ser utilizados para o tratamento da DC e, em 1972, o benznidazol também foi proposto como possibilidade terapêutica.

Aos dias atuais, o benznidazol e o nifurtimox são os fármacos eleitos e disponíveis para o tratamento da DC, já que até o momento são os que apresentam na rotina médica e experimentalmente a melhor eficácia e segurança (ROMERO; MORILLA, 2010; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Contudo, apesar de ambos os fármacos promoverem até 80% de cura parasitológica durante a fase aguda, na fase crônica apresentam baixa eficácia (DOCAMPO, 2001). Outro importante fator deletério que dificulta a adesão ao tratamento são a toxicidade e os efeitos colaterais, tais como: edema generalizado, afecções cutâneas, dores articulares, distúrbios gastrointestinais, fraqueza muscular e hipoplasia de medula óssea (PONTES *et al.*, 2010). Estudos recentes mostraram maior tolerabilidade à droga e redução de efeitos colaterais ao avaliar tratamento encurtado com benznidazol em indivíduos adultos (TORRICO *et al.*, 2021). Novas perspectivas terapêuticas são estudadas e avaliadas experimentalmente com o objetivo de melhorar a eficácia do

tratamento em ambas as fases da doença, aumentar a adesão dos pacientes, diminuir os efeitos colaterais e proporcionar qualidade de vida. Dentre estas alternativas, destacam-se os inibidores da biossíntese de ergosterol, derivados nitroimidazólicos e imunomoduladores.

No âmbito da medicina veterinária, até o presente momento não há drogas licenciadas para o tratamento da DC canina. Contudo, pesquisas nesta área são uma importante vertente, já que a possibilidade de realizar um tratamento eficaz em cães impacta diretamente na saúde pública e permite reduzir o risco de transmissão de zoonose, sobretudo em áreas endêmicas. Diversos estudos são voltados à avaliação de protocolos terapêuticos que possam ser utilizados em cães. Em pesquisas anteriores, foi observado que a associação de itraconazol com amiodarona apresentou efeito tripanocida, portanto foi eficaz no tratamento para a infecção por *T. cruzi*, ainda que parte da população canina estudada tenha manifestado efeitos adversos (MADIGAN *et al.*, 2019). A amiodarona possui uma ação antiarrítmica e reporta-se também a possibilidade de atuar diretamente contra o *T. cruzi*, a partir da interrupção da homeostase do cálcio no parasita e bloqueio da biossíntese de esteróis. Já o itraconazol, a partir da inibição do citocromo P450C14 α -esterol desmetilase, consegue ser eficaz contra o parasita. Outros estudos apontam que o benznidazol induz na espécie canina diminuição significativa da parasitemia logo ao início do tratamento, bem como a atenuação das alterações cardíacas. No entanto, o fármaco não foi capaz de prevenir o desenvolvimento da cardiomiopatia em animais tratados (SANTOS *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2016).

Aliado ao tratamento tradicional, outras medidas podem ser adicionadas ao protocolo terapêutico aos portadores da DC. Em seres humanos, é observado que diversos agentes antioxidantes podem atuar com potenciais benefícios para o controle do estresse oxidativo em células e tecidos do hospedeiro. A associação do benznidazol com os antioxidantes (melatonina, vitamina C/E, cúrcuma, resveratrol) apresenta resultados promissores na redução dos níveis plasmáticos e cardíacos dos produtos da peroxidação lipídica, em que infere-se incrementar a eficácia das terapias antiparasitárias convencionais (SÁNCHEZ-VILLAMIL *et al.*, 2020). Devido a estes benefícios, novos estudos na área devem ser conduzidos, levando em consideração o tipo de antioxidante, tempo de administração e dose, além da possível implementação em outros hospedeiros não humanos, como os cães.

2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE

A DC é uma zoonose com relevância mundial que acomete milhões de pessoas ao redor do mundo. Apesar da sua importância e de diversos países elaborarem programas de saúde para o seu controle, ela ainda persiste como um problema de saúde pública. Em áreas endêmicas, a transmissão vetorial é recorrente e os cães atuam como os principais reservatórios do *T. cruzi* em ciclos domésticos e peridomésticos. Desta forma, elaborar estratégias de controle da DC canina e de combate ao vetor são essenciais para interromper o ciclo de transmissão para humanos e diminuir a ocorrência de novos casos. Um estudo conduzido no Texas demonstrou taxa de incidência de 30,7% em uma coorte de 64 cães de 10 canis acompanhados por um período de um ano, indicando elevado risco de infecção em ambientes endêmicos e de aglomeração de animais, bem como a necessidade de instituir métodos de combate e controle dos vetores eficazes e mais integrados (BUSSELMAN et al., 2021).

Diversos estudos analisaram o impacto de diferentes estratégias de combate e controle da DC (REITHINGER et al., 2005; GURTLER et al., 2009; LOZA et al., 2017; CUNHA et al., 2019; LAIÑO et al., 2019; MADIGAN et al., 2019; TRAVI., 2019). No âmbito da medicina veterinária, o uso de inseticidas e medicamentos tópicos com ação repelente apresentou resultados promissores na prevenção da infecção de cães residentes em áreas endêmicas (LOZA et al., 2017). Dentre as alternativas avaliadas, observou-se que cães que utilizavam colares impregnados por deltametrina apresentavam menor taxa de repasto sanguíneo do vetor e redução da sobrevivência do triatomíneo (REITHINGER et al., 2005; 2006). Além da deltametrina, outros estudos foram conduzidos empregando o fipronil, um inseticida com grande aplicabilidade na medicina veterinária e que atua contra ampla gama de artrópodes hematófagos. Apesar do fipronil ter como vantagem a possibilidade de ser utilizado em diversas espécies animais e ausência de efeitos adversos quando empregado em doses recomendadas, a sua ação foi limitada sobre os triatomíneos (GURTLER et al., 2009; AMELOTT; CATALÁ; GORLA, 2012; GURTLER et al., 2014). Além da aplicabilidade limitada, foi observado que o uso de drogas a base de piretróide, induzia ao longo do tempo uma resistência na sobrevivência da população de *T. infestans* na Argentina, Bolívia, Brasil, enquanto foi encontrada resistência ao piretróide na população de *Rodhnius prolixus* na Venezuela e Colômbia (VASSENA; PICOLLO; ZERBA, 2000; PICOLLO et al., 2005; LARDEUX et al., 2010; BUSTAMANTE; GONÇALVES DIOTAIUTI, GORLA; 2016; CALDERÓN et al., 2020).

Mais recentemente, os inseticidas orais de dose única tais como o fluralaner, afoxolaner e spinosad também foram investigados quanto a atividade contra o *T. cruzi*. Estes medicamentos possuem larga aplicação, principalmente por benefícios como: facilmente acessíveis,

relativamente de baixo custo, fácil administração, comprimido palatável, longa duração, boa segurança, eficaz para controle de ecto e endoparasitas e sem efeitos colaterais. Observou-se que após 7,3 semanas de uma única dose oral destes fármacos ocorreu dentro de cinco dias, 100% da mortalidade dos triatomíneos (LOZA *et al.*, 2017). Em experimento realizado com o fluralaner, apesar deste não ter sido eficaz em coibir o repasto sanguíneo do vetor, quase todos os triatomíneos morreram dentro de 24 horas após realizarem o repasto sanguíneo em cães tratados com uma única dose oral (LAIÑO *et al.*, 2019). Em novos estudos foi observado que a administração do medicamento aos cães ocasionou 100% da mortalidade dos triatomíneos em até 7 meses após o uso, o que sugere o grande potencial do mesmo como uma alternativa de controle da transmissão da DC canina, sobretudo em áreas endêmicas (QUEIROGA *et al.*, 2021).

Assim como para outras doenças infecciosas, a utilização das vacinas de DNA foi investigada em estudos experimentais para a DC. Infere-se que estas vacinas são parcialmente eficazes e quando utilizadas em modelos experimentais podem reduzir o grau de parasitemia, atenuar o processo inflamatório em tecido cardíaco e aumentar o tempo de sobrevivência do animal infectado por *T. cruzi* (DUMONTEIL *et al.*, 2004). Em cães, estes resultados são variados desde o nível de proteção de leve a moderado, como também o grau de comprometimento do tecido cardíaco e conservação de sua estrutura (ARCE FONSECA *et al.*, 2020). No entanto, estudos mais recentes indicam que a terapia com as vacinas de DNA, por atuarem na modulação da resposta imune dos cães tratados, possui potencial contra a progressão da DC, retardando o surgimento de alterações cardíacas, bem como provê aos animais expostos uma resistência parcial contra o *T. cruzi* (QUIJANO-HERNANDEZ *et al.*, 2008; APARICIO-BURGOS *et al.*, 2011; RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2012; QUIJANO-HERNANDEZ *et al.*, 2013; ARCE FONSECA *et al.*, 2020).

2.8 EPIDEMIOLOGIA

A DC é uma das principais enfermidades com impacto na saúde pública em 21 países da América Latina. No entanto, por se tratar de uma doença negligenciada, está relacionada a condições de pobreza, acesso restrito ao diagnóstico e tratamento, bem como escassez de opções terapêuticas seguras e eficazes (BARR, 2009; CHAVES *et al.*, 2017; ALENCAR *et al.*, 2020). A epidemiologia da DC mudou nas últimas décadas. Anteriormente era considerada uma doença rural relacionada a casas de pau-a-pique. Todavia, o êxodo rural experimentado pelo

Brasil e diversos países endêmicos, levou a DC para a periferia dos grandes centros urbanos. Além disso, o aumento do fluxo migratório de indivíduos infectados de áreas endêmicas para países indenes tornou a DC um problema de saúde pública mundial (Figura 9), em especial países da Europa, América do Norte, Oceania e Ásia (LIDANI *et al.*, 2019; OMS, 2010). Em ambas as situações, devido à ausência do vetor nestas novas localidades, vias não clássicas de transmissão do *T. cruzi* ganharam evidência, como a vertical e a transfusional.

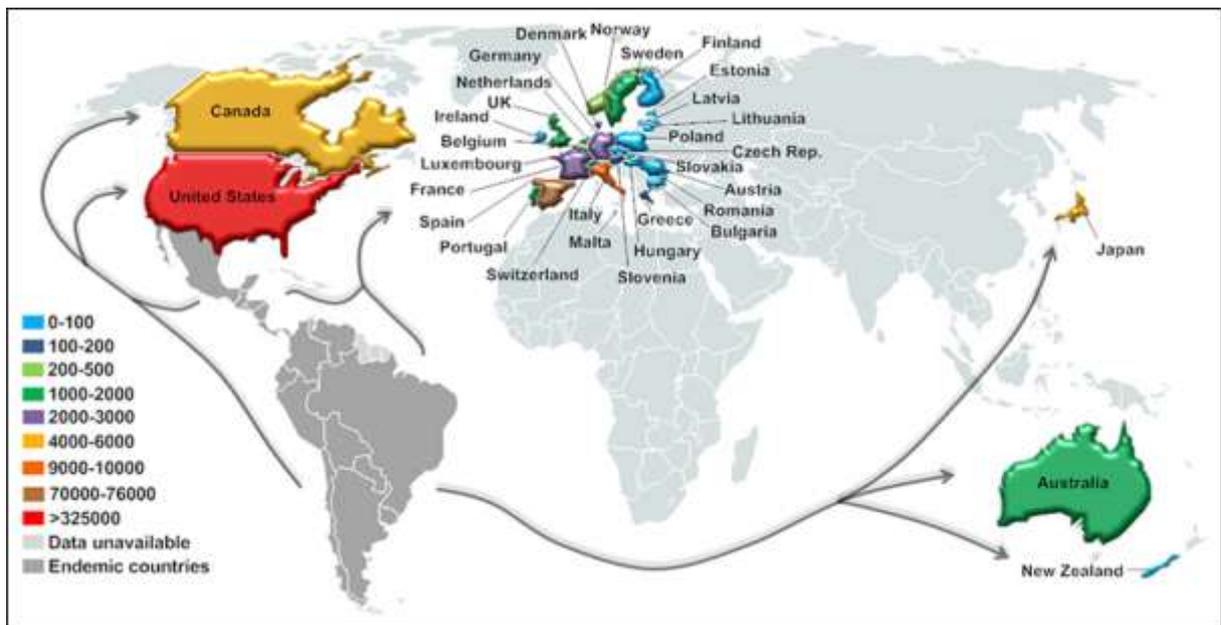


Figura 9 - Rotas de migração de portadores crônicos da doença de Chagas de países endêmicos da América Latina para países não endêmicos.

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

Além do fator socioeconômico e migratório, mudanças climáticas, intensificação de atividade agrícola, processo de urbanização e desmatamento ocasionaram aumento do risco de infecção humana, devido a sua aproximação aos ciclos silvestre e peridoméstico, assim como garantiu aos hospedeiros infectados adaptação a novas regiões (COURA, 2013; KLOTZ *et al.*, 2014; MAGGI; KRAMER, 2019).

Os triatomíneos, responsáveis por realizar a transmissão vetorial, estão presentes na América do Sul e Central, e também no sul dos Estados Unidos, sendo que dentre as mais de 150 espécies existentes, 52 delas são encontradas no Brasil (JARAMILLO *et al.*, 2000). Nestas regiões, a transmissão vetorial comporta-se como importante via de propagação. Atualmente, estima-se que 5-7 milhões de pessoas ao redor do mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*, ocasionando anualmente 7.500 óbitos em decorrência deste agravo (OMS, 2019).

Devido à alta prevalência, impacto na saúde pública e risco global de infecção, é preciso elaborar estratégias em programas de saúde nacionais e internacionais voltados ao combate e controle da DC. Poucos estudos se dedicaram à avaliação de soroprevalência de reservatórios domésticos (Figura 10). No Brasil, os estudos de prevalência realizados utilizaram com maior frequência a sorologia como ferramenta diagnóstica e mostraram valores que variaram de 0,4% (TOME *et al.*, 2011) em São Paulo até 53% no Mato Grosso do Sul (DE OLIVEIRA PORFÍRIO *et al.*, 2018). A Figura 10 reúne os estudos disponíveis na literatura científica que avaliaram a partir de cortes transversais a soroprevalência de anticorpos anti-*T. cruzi* em animais de companhia. As avaliações foram realizadas com testes *in house* padronizados por laboratórios distintos, utilizando diversas plataformas diagnósticas ou testes comerciais para humanos adaptados para uso em animais. Desta forma, o desenvolvimento de testes sorológicos comerciais com elevados valores de desempenho, capazes de detectar a doença em reservatórios domésticos é extremamente importante na vigilância epidemiológica e controle desta zoonose.

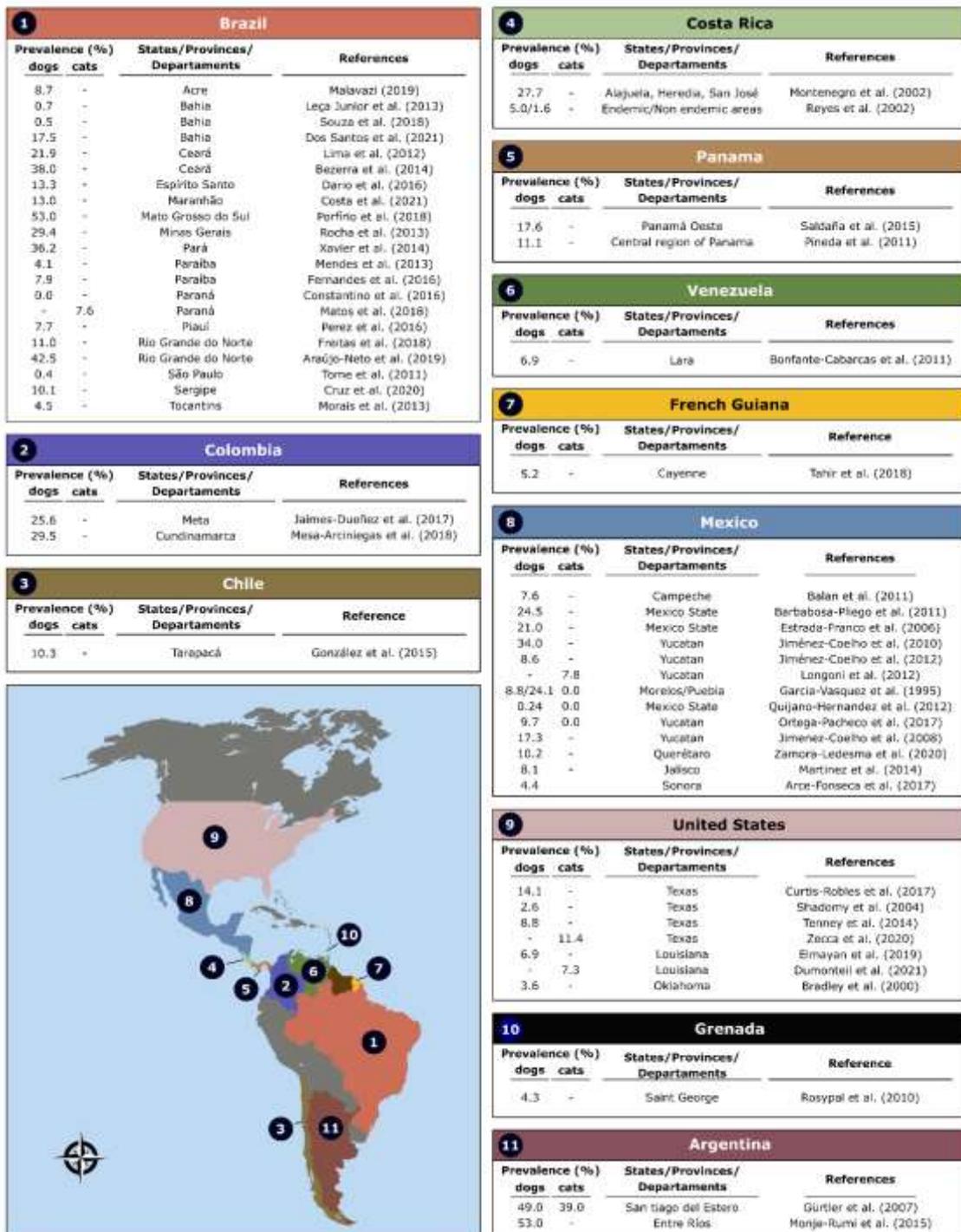


Figura 10 - Desenho representativo da soroprevalência do *Trypanosoma cruzi* nas espécies canina e felina de acordo com diferentes regiões endêmicas situadas nas Américas.

Fonte: Grupo SerdYtech.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho diagnóstico dos antígenos recombinantes quiméricos do *Trypanosoma cruzi* (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4) em imunoenaios para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em cães na forma crônica da doença de Chagas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar os testes imunoenzimáticos no formato ELISA indireto utilizando os antígenos quiméricos IBMP do *T. cruzi*;
- Estabelecer o padrão ouro para definição de cães positivos e negativos através da análise de classe latente utilizando os antígenos quiméricos IBMP do *T. cruzi*;
- Avaliar o desempenho diagnóstico dos antígenos quiméricos IBMP do *T. cruzi* utilizando amostras de cães positivos para a doença de Chagas;
- Avaliar a reatividade cruzada dos antígenos quiméricos IBMP do *T. cruzi* utilizando amostras séricas de cães portadores para outras doenças infecto-parasitárias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo com a finalidade de avaliar o potencial diagnóstico dos antígenos quiméricos IBMP do *T. cruzi* em imunoenaios para identificação da DC crônica na espécie canina. Este estudo refere-se a uma validação de métodos diagnósticos, que sucede ao estudo de fase I, no qual foram estabelecidos parâmetros de desempenho em amostras de conveniência, discriminadas como negativas ou positivas a partir da comparação dos resultados obtidos ao teste padrão ouro. No estudo de fase II, o quantitativo amostral é determinado estatisticamente e todas as amostras inclusas são investigadas quanto a probabilidade do método diagnóstico fornecer resultados positivos em indivíduos de fato infectados e resultados negativos em indivíduos não infectados por *T. cruzi*.

4.1.1 Locais de experimentação e procedimentos

Os experimentos foram executados nos Laboratórios Avançado de Saúde Pública (LASP, Instituto Gonçalo Moniz - IGM /FIOCRUZ-BA), de Genômica e de Proteínas (Instituto Carlos Chagas - ICC/FIOCRUZ-PR). A produção e purificação dos antígenos quiméricos IBMP do *T. cruzi* foram realizadas nos Laboratórios de Genômica e de Proteínas, respectivamente. A caracterização do painel sorológico e a avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos através dos imunoenaios pela metodologia de ELISA indireto ocorreram no LASP. A análise de classe latente foi realizada em colaboração com Dra. Leila Denise Alves Ferreira Amorim, do Departamento de Estatística do Instituto de Matemática da Universidade Federal da Bahia.

4.1.2 Considerações éticas

O presente estudo está inserido no projeto denominado “Avaliação e validação do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do *Trypanosoma cruzi*”, e encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz/BA; Protocolo 002/2017). Uma cópia do Parecer encontra-se disponível no Anexo A.

4.2 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES QUIMÉRICOS

4.2.1 Expressão e purificação

Os antígenos recombinantes quiméricos foram obtidos a partir da colaboração do Instituto Carlos Chagas (ICC - Fiocruz-PR), responsável por realizar a expressão e purificação das moléculas IBMP. A obtenção destes antígenos já foi previamente descrita na literatura por Santos *et al*, em 2016. Em resumo, as sequências nucleotídicas referentes aos quatro antígenos quiméricos foram adquiridas comercialmente e clonadas em vetor pET28a para posterior expressão em *Escherichia coli* BL21-*Star*, a qual foi cultivada no meio de Luria Bertani (LB) suplementado com 0,5 M de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Após indução da expressão com IPTG, as bactérias foram lisadas por microfluidificação e a purificação realizada por cromatografia de afinidade e de troca iônica.

4.2.2 Determinação da concentração

A quantificação dos antígenos purificados foi realizada a partir do processo de fluorimetria, utilizando o equipamento Qubit 2.0 (Life Technologies/ Thermo Fischer Scientific Inc., EUA). Em termos gerais, esta técnica é realizada a partir do emprego de corante fluorescente que emite sinais quando ligado às proteínas. Posteriormente as amostras foram mescladas à solução fornecida pelo fabricante, incubadas durante dois minutos e a fluorescência emitida determinada pelo equipamento.

4.2.3 Análise da integridade molecular dos antígenos através de SDS-PAGE

Após o recebimento dos antígenos IBMP no LASP, géis de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio) foram preparados com o objetivo de avaliar a pureza e integridade das moléculas. Aproximadamente 1 μ g de cada antígeno foi adicionado às canaletas do gel e o material submetido à eletroforese com 20 mA de corrente e coloração pelo Coomassie Blue R250 (Bio-Rad, EUA). Para este processo utilizou-se géis de concentração e de separação que foram preparados a uma concentração de acrilamida a 4,5% e 15%, respectivamente. O marcador de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope™ Prestained Standards (BioRad, EUA).

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

4.3.1 Dimensionamento amostral

Por se tratar de um estudo de validação de método diagnóstico de fase II, fez-se necessária a determinação do dimensionamento amostral, ao contrário da avaliação da fase I, que possui caráter exploratório e utiliza amostras de conveniência. No presente estudo, a amostragem foi definida com auxílio do programa estatístico OpenEpi (DEAN *et al.*, 2013) para estimativa de proporções, supondo-se sensibilidade de 99% e especificidade de 99%, adotando-se um erro absoluto (semi-amplitude do intervalo de confiança) de 1,5% e nível de confiança em 95%. Para avaliação de reações cruzadas foi utilizada a estimativa da distribuição binominal negativa, extrapolando em 5% o quantitativo de reações cruzadas possivelmente encontradas para outras doenças infecciosas.

4.3.2 Obtenção dos painéis sorológicos

Para a composição dos painéis sorológicos utilizados no presente estudo, amostras séricas de cães naturalmente e experimentalmente infectados pelo *T. cruzi* foram cedidas por Instituições parceiras localizadas em diferentes regiões geográficas do país, a saber:

- Bahia (Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz-BA; Universidade Federal do Oeste da Bahia, UFOB);
- Maranhão (Universidade Estadual do Maranhão);
- Minas Gerais (Instituto René Rachou, Fiocruz-MG; Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP);
- Pernambuco (Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE);
- Rio de Janeiro (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz-RJ);
- Rio Grande do Norte (Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN);
- Sergipe (Instituto de Tecnologia e Pesquisa, ITP).

Para a avaliação da reatividade cruzada, foram utilizadas amostras positivas para *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Dirofilaria* spp., *Ehrlichia* spp. e *Leishmania* spp., e cedidas pelo Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Aggeu Magalhães (LIMP/IAM-Fiocruz/PE). Amostras de cães positivos para *Leishmania* spp. e *Leptospira* spp. foram também obtidas graças à colaboração com o Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro e

Epidemiologia (LAIPHE/IGM/Fiocruz-BA). Assim que todas estas amostras eram recepcionadas no LASP, ficavam armazenadas a -20°C até o processamento dos imunoenaios.

4.3.3 Definição do padrão ouro e caracterização dos painéis sorológicos

A definição do perfil sorológico das amostras incluídas no presente estudo foi realizada através do modelo de classe latente, previamente estabelecido (SANTOS *et al.*, 2017a) e validado (DALTRO *et al.*, 2019) para diagnóstico em humanos. Na ausência de um teste padrão-ouro, a análise de classe latente (LCA) é sugerida como um método para a obtenção dos parâmetros de desempenho de um teste diagnóstico. A LCA pressupõe que, embora a presença da doença permaneça desconhecida, os métodos de avaliação disponíveis oferecem uma aproximação do estado real da doença sendo, desta forma, capaz de fornecer uma estimativa da presença ou ausência da doença. Através desta ferramenta, as amostras foram classificadas como negativas ou positivas com base nos resultados obtidos pelo ELISA indireto utilizando os quatro antígenos IBMP.

4.3.4 Critérios de inclusão

Foram inseridas neste estudo amostras séricas de cães submetidas a classificação sorológica pela LCA, na ausência de hemólise, lipemia, e com volume satisfatório para processamento dos imunoenaios ($> 50\ \mu\text{l}$).

4.3.5 Critérios de não inclusão

Não foram incluídas neste estudo as amostras séricas que apresentavam volume insatisfatório para processamento ($< 50\ \mu\text{l}$), bem como as amostras que evidenciavam graus moderado a intenso de hemólise e/ou lipemia.

4.4 EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.4.1 Definição dos pontos de corte (CO – *cut-off*)

Os valores de CO foram determinados individualmente para cada microplaca. Os dados das densidades ópticas (DO) foram exportados para o programa computacional GraphPad Prism 8 para Windows versão 8.01 (GraphPad Software Inc., Chicago-IL, EUA) e os valores de CO definidos a partir da análise da curva ROC (GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2000). A área abaixo da curva ROC (AUC – *area under ROC*) foi calculada utilizando intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

4.4.2 Normalização dos dados

A normalização dos dados teve como objetivo a uniformização dos dados obtidos, afastando dessa forma, a possibilidade de variabilidade dos resultados inerentes a cada microplaca. Para cada placa foi calculado o índice de reatividade (IR) das amostras a partir da fórmula abaixo:

$$\text{Índice de reatividade (IR)} = \frac{\text{DO da amostra}}{\text{Cut-off (CO) da placa}}$$

A partir do IR, cada amostra foi categorizada como positiva ou negativa, em que resultados do IR inferior a 1,0 foram considerados negativos e amostras com resultado do IR igual ou superior a 1,0 foram consideradas positivas. Amostras que obtiveram valores de IR entre 0,80 a 1,20, foram consideradas “*borderline*”, e por isso realizou-se a repetição da análise, visando evitar possíveis erros sistemáticos e aleatórios. Os valores de IR foram representados em gráficos obtidos pelo programa computacional GraphPad Prism 8 para Windows versão 8.01 (GraphPad Software Inc., Chicago-IL, EUA).

4.4.3 Avaliação dos parâmetros de desempenho

O potencial diagnóstico das moléculas IBMP foi avaliado a partir das variáveis sensibilidade, especificidade, acurácia, valores de verossimilhança positiva e negativa, *odds ratio* diagnóstico e probabilidades pré-teste e pós-teste, bem como seus intervalos de confiança a 95%. Para a obtenção dos valores destes parâmetros, foram utilizadas tabelas de dupla entrada

(2x2), em que foram relacionados os resultados obtidos através da utilização das proteínas recombinantes IBMP com aqueles obtidos através do padrão-ouro previamente definido (LCA). Os valores da área abaixo da curva ROC (AUC) foram determinados para avaliação da capacidade discriminatório global dos antígenos ao analisar amostras positivas e negativas para a DC. Os valores encontrados foram classificados em excelentes ($AUC = 100\%$), elevados ($99\% \leq AUC \leq 82\%$), moderados ($81\% \leq AUC \leq 62\%$) ou baixos ($61\% \leq AUC \leq 51\%$) (SWETS, 1988). O índice de *Kappa* de Cohen (κ), foi utilizado para medir o grau de concordância entre os resultados obtidos pelos testes definidos como padrão ouro e o ELISA indireto com as moléculas IBMP. Este índice tem como valor máximo 1,0, em que é atribuído no momento que existe total concordância de reprodutibilidade e avaliações, e valor mínimo zero, quando não há concordância entre as avaliações e reprodutibilidade. A interpretação do índice κ foi realizada conforme as seguintes definições: valores de $\kappa = 1,0$ representavam concordância perfeita; $0,99 \leq \kappa < 0,81$ representavam concordância quase perfeita; $0,80 \leq \kappa < 0,61$ representavam concordância substancial; $0,60 \leq \kappa < 0,41$ representavam concordância moderada; $0,40 \leq \kappa < 0,21$ representavam concordância justa, $0,20 \leq \kappa < 0$ representavam concordância leve; e quando $\kappa = 0$ representava ausência de concordância (LANDIS; KOCH, 1977). Além do desempenho individual de cada molécula, o desempenho diagnóstico em série e em paralelo empregando combinações de dois antígenos IBMP também foi considerado no presente estudo. Dessa forma, os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia foram obtidos conforme fórmulas descritas na Tabela 1 (MEDRONHO; PEREZ, 2009):

Tabela 1 - Fórmulas para obtenção da sensibilidade, especificidade e acurácia utilizando o esquema de análise em série e em paralelo.

	Avaliação em série	Avaliação em paralelo
Sen =	$Sen A \times Sen B$	$(Sen A + Sen B) - (Sen A \times Sen B)$
Esp =	$(Esp A + Esp B) - (Esp A \times Esp B)$	$Esp A \times Esp B$
Acc =	$(Sen \times Prevalência) + Esp (1 - prevalência)$	$(Sen \times Prevalência) + Esp (1 - prevalência)$

Legenda: A (Teste A); Acc (Acurácia); B (Teste B); Esp (Especificidade); Sen (Sensibilidade).

Fonte: Medronho; Perez (2009).

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS IBMP

4.5.1 Estudo de fase II

O estudo de fase II foi realizado com a finalidade de avaliar o potencial diagnóstico dos antígenos IBMP. Para este objetivo, foram utilizadas amostras séricas de cães positivos e negativos para a DC com perfil sorológico definido pela LCA. As amostras foram avaliadas conjuntamente e subdivididas nas regiões geográficas das quais foram oriundas, a saber: Bahia, Maranhão, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte. As reações de ELISA foram realizadas conforme descrito por Leony e colaboradores (2019). Resumidamente, microplacas de poliestireno de 96 poços e fundo chato (Nunc Maxisorp[®], EUA) foram sensibilizadas com 100 µl poço da solução tampão carbonato/bicarbonato (50 mM, pH 9,6) contendo os antígenos IBMP separadamente nas quantidades de 25 ng. Em seguida, adicionou-se 100 µl da solução WellChampion[™] (lote 130703; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) a cada poço, com a finalidade de sensibilização e estabilização da placa. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, as microplacas foram invertidas em uma única vez a fim de desprezar o conteúdo e, posteriormente, acondicionadas em estufa a 37° C por 3 horas para secagem. Ao final deste período, as microplacas estavam prontas para uso. Para a realização dos imunoenaios, 100 µl das amostras séricas, diluídas previamente em 1:100 em tampão PBS (fosfato de sódio 10 mM e cloreto de sódio 150 mM, pH 7.4), foram adicionadas às microplacas, as quais foram seladas e acondicionadas em estufa a 37° C por uma hora. Ao final da incubação, as placas passaram por processo de lavagem cinco vezes com 250 µl de solução de lavagem (PBS-Tween; fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e 0,5% de Tween-20, pH 7,4) para a remoção do material não adsorvido. Posteriormente, 100 µl do anticorpo secundário nas diluições de 1:20.000 (IBMP-8.3) e 1:40.000 (IBMP-8.1, IBMP-8.2 e IBMP-8.4) foram adicionados a cada poço. Trata-se de uma anti-globulina de cão (anti-IgG) conjugada à peroxidase e produzida a partir da inoculação de IgG canina (Bio-Manguinhos, Fiocruz-RJ, Brasil). Este anticorpo foi gentilmente cedido por Dr. Edmilson Domingues da Silva, do Laboratório de Tecnologia Diagnóstico (LATED/Bio-Manguinhos, Fiocruz-RJ), para a realização do presente estudo. Após a adição do anticorpo secundário, as microplacas foram novamente seladas e acondicionadas em estufa à 37° C por 30 minutos. Ao final desta etapa, as microplacas passaram novamente por processo de lavagem com solução tampão PBS-Tween, conforme descrito anteriormente. Em seguida, 100 µl do cromógeno TMB Plus (lote 111011; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) foram adicionados a cada poço e a microplaca incubada a temperatura ambiente por 10 min na ausência de luz. Após a incubação,

as reações foram interrompidas com adição de 50 µl de H₂SO₄ a 0.3 M. A coloração resultante das reações foi quantificada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm (SPECTRAMax 340PC®, EUA). Para a análise e interpretação dos dados, os valores obtidos referentes à densidade óptica (DO) dos poços destinados aos brancos foram subtraídos dos valores das DO das amostras testadas. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenhos foram determinados para cada um dos antígenos. Os valores de IR e dos parâmetros de desempenho e de IR foram comparados entre as moléculas visando verificar a capacidade diagnóstica de cada uma individualmente.

4.5.2 Estudo de reatividade cruzada

A avaliação da reatividade cruzada foi conduzida através da utilização de amostras séricas de cães portadores de anaplasmose, babesiose, dirofilariose, erliquiose, leishmaniose e leptospirose; porém negativas para a DC através da LCA. As reações de ELISA foram realizadas como descrito no subtópico anterior e as médias geométricas dos IR e os parâmetros de desempenho foram determinados para cada um dos antígenos.

4.5.3 Concordância de desempenho com teste comercial adaptado para cães

Para avaliar a concordância dos antígenos IBMP com um teste comercial humano adaptado para diagnóstico da DC em cães, selecionou-se amostras negativas e positivas para a DC, as quais foram submetidas ao Gold Elisa Chagas (REM Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil). Este kit foi adaptado para uso em cães e os dados disponibilizados na literatura (LEONY *et al.*, 2019). As reações de ELISA foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Resumidamente, os ensaios foram conduzidos a partir da diluição das amostras de 1:800. Após diluição, adicionou-se 100 µl das amostras às microplacas, as quais foram seladas e incubadas à 37° C durante 30 minutos. Após lavagem das microplacas com PBS-Tween, 100 µl do anticorpo secundário anti-IgG canina na diluição de 1:40.000 (Bio-Manguinhos, Fiocruz-RJ, Brasil) foram adicionados a cada poço. As microplacas seladas novamente foram incubadas à 37° C por 30 minutos, então, fez-se uma nova etapa de lavagem. O próximo passo consistiu na adição de 100 µl da solução TMB com posterior incubação das microplacas em ambiente escuro por 10 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 50 µl da solução de parada visando interromper o desenvolvimento de cor, que foi

mensurada em espectrofotômetro (SPECTRAmax 340PC®, EUA) a 450 nm. Os valores de *cut-off* foram estabelecidos a partir da curva ROC utilizando 6 controles, sendo 3 positivos e 3 negativos para DC. Ao final, os resultados foram normalizados com objetivo de torná-los comparáveis quantitativamente àqueles obtidos para os antígenos IBMP. Determinou-se as médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenhos e os resultados comparados aos dos antígenos IBMP.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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 utilizou-se 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 utilizou-se 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 significância estatística. O programa estatístico GraphPad Prism 8 para Windows versão 8.01 (GraphPad Software Inc., Chicago-IL, EUA) foi adotado para realização dos testes estatísticos.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA INTEGRIDADE MOLECULAR DOS ANTÍGENOS ATRAVÉS DE SDS-PAGE

A análise eletroforética dos antígenos IBMP mostrou ausência de contaminantes bacterianos e presença de bandas distintas e bem conservadas dos quatro antígenos IBMP (Figura 11).

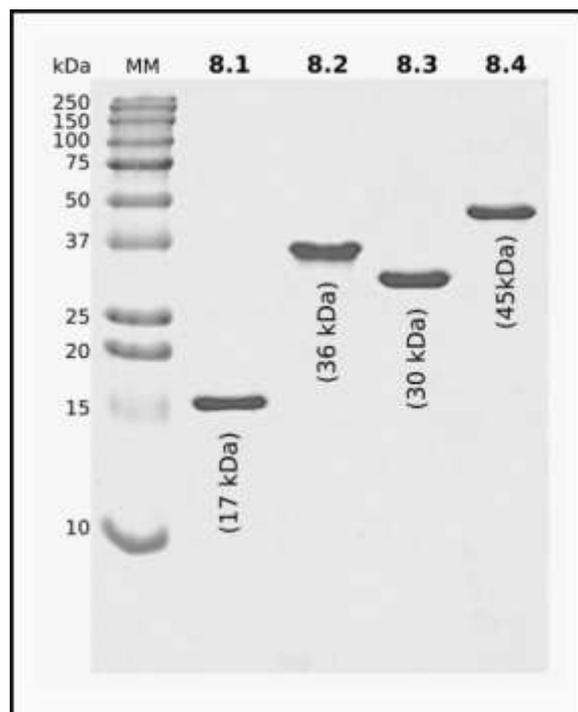


Figura 11 - SDS-PAGE dos antígenos IBMP corados pelo azul de Coomassie.

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

Nota: Adicionado 1 μ g de antígeno/poço.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

5.2.1 Dimensionamento amostral

Considerando os parâmetros adotados (sensibilidade de 99% e especificidade de 99%, erro absoluto de 1,5% e nível de confiança em 95%), o quantitativo amostral para o estudo de fase II foi estimado em 169 amostras positivas e 169 negativas para a DC. Para a avaliação da

reatividade cruzada a distribuição binominal negativa estimou que para cada 100 amostras analisadas, haveria 5% de chance de se encontrar uma reação cruzada (Figura 12).

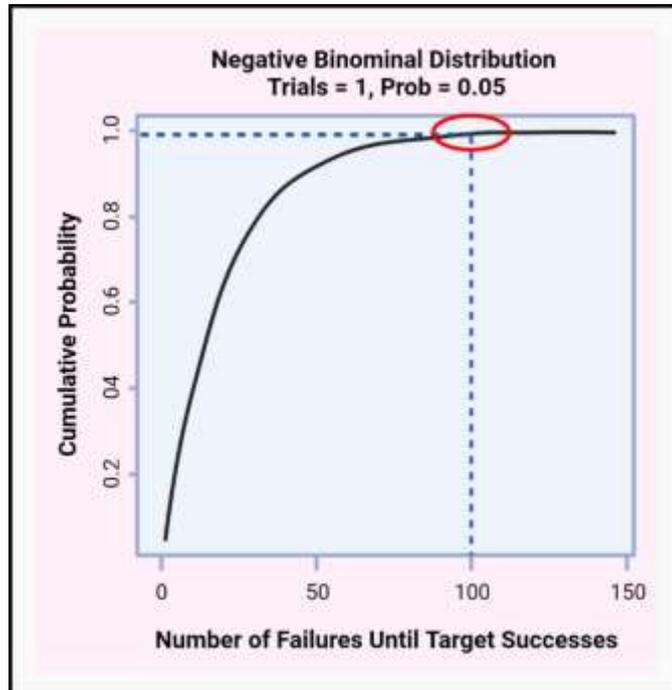


Figura 12 - Distribuição binominal negativa para estimativa do número amostral para estudo da reatividade cruzada utilizando os antígenos IBMP.
Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.2 Definição do padrão ouro

Um total de 2.012 amostras foram utilizadas no presente estudo. Deste quantitativo, 332 foram aleatoriamente sorteadas para estimar os padrões de resposta e acurácia da LCA usando os quatro antígenos quiméricos do *T. cruzi*. A Tabela 2 mostra a probabilidade de cada antígeno quimérico prever com precisão a positividade das amostras para a DC, atingindo um valor de 79,1% para o IBMP-8.1, 88,1% para o IBMP-8.2, 73,4% para o IBMP-8.3 e 73,2% para o antígeno IBMP-8.4. Por outro lado, a probabilidade de uma determinada amostra negativa ser classificada como positiva para DC variou de 0,6% para IBMP-8.2 a 8,3% para IBMP-8.1. Valores intermediários foram obtidos para IBMP-8.3 (5,1%) e IBMP-8.4 (1,9%). O valor de entropia foi calculado em 0,949, indicando um claro delineamento entre os padrões de resposta da classe latente.

Tabela 2 - Probabilidades condicionais e prevalências das classes latentes segundo um modelo com 2 classes para biomarcadores de doença de Chagas.

Indicadores	Positividade dos exames	LCA duas classes	
		Entropia: 0,949	
	[Global] N = 332 %	Classe 1 (Positivas) (n=49; 14.8%) %	Classe 2 (Negativas) (n=283; 85.2%) %
IBMP-8.1	19,3	79,1	8,3
IBMP-8.2	14,2	88,1	0,6
IBMP-8.3	15,7	73,4	5,1
IBMP-8.4	13,0	73,2	1,9

Legenda: LCA (análise de classe latente); N (número amostral).

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 13 ilustra os 16 padrões de resposta da classe latente agrupados de acordo com os resultados diagnósticos obtidos para as amostras positivas ($n = 49$) e negativas ($n = 283$) testadas com os quatro antígenos quiméricos IBMP do *T. cruzi*. Os padrões de resposta da classe latente foram classificados de acordo com o número de ensaios positivos: P1 (100% de resultados negativos), P2 (75% de resultados negativos), P3 (50% de resultados negativos), P4 (25% de resultados negativos) e P5 (sem resultados negativos). Apesar da variabilidade no número de amostras classificadas em cada padrão, as maiores frequências foram observadas nas categorias P1 ($n = 239$), P2 ($n = 40$) e P5 ($n = 25$). As amostras foram consideradas positivas quando pelo menos dois antígenos quiméricos apresentaram positividade (P3-P5), com probabilidade *à posteriori* (PP) superior a 68%. Todavia, a positividade conjunta das moléculas IBMP-8.1 e IBMP-8.3 apresentou probabilidade *à posteriori* inferior a 50% (PP = 44,8%), indicando negatividade para as amostras que obtiveram este padrão de resposta. Similarmente, as amostras foram consideradas negativas quando nenhuma ou apenas uma molécula IBMP testou positiva (P1 e P2), com PP < 31%.

IBMP-	8.1	8.2	8.3	8.4	N	PP (%)	LCS
P1	-	-	-	-	239	0,0	Neg
P2	+	-	-	-	21	1,6	Neg
	-	+	-	-	2	30,9	Neg
	-	-	+	-	12	1,9	Neg
	-	-	-	+	5	5,0	Neg
P3	+	+	-	-	4	94,9	Pos
	+	-	+	-	4	44,8	Neg
	+	-	-	+	1	68,7	Pos
	-	+	+	-	2	95,8	Pos
	-	+	-	+	6	98,4	Pos
	-	-	+	+	1	73,0	Pos
P4	+	+	+	-	5	99,9	Pos
	+	+	-	+	2	100	Pos
	+	-	+	+	2	99,1	Pos
	-	+	+	+	1	100	Pos
P5	+	+	+	+	25	100	Pos

Figura 13 - Análise de classe latente (LCA) utilizada para caracterização do perfil sorológico do painel amostral inscrito no estudo.

Legenda: N (número amostral), Neg (negativo), P (padrão), PP (probabilidade à posteriori), LCS (padrão de classe latente), Pos (positivo).

Fonte: Elaborado pela autora.

Após estabelecimento do padrão ouro através da LCA, todo o painel sérico obtido através de colaborações realizadas com Instituições parceiras foi submetido a classificação descrita acima (P1-P5) e as amostras categorizadas como positivas ou negativas, desde que obedecessem aos critérios citados abaixo:

- **Amostras positivas para DC:** Foram classificadas como positivas as amostras com resultado positivo em duas (exceto IBMP-8.1 + IBMP-8.3), três ou nas quatro moléculas IBMP através do ELISA indireto, com probabilidade à *posteriori* de 68,7-100% desta classificação estar correta (Figura 13);
- **Amostras negativas para DC:** Foram classificadas como negativas as amostras com resultado negativo em, no mínimo, três das quatro moléculas IBMP no ELISA indireto, com probabilidade à *posteriori* de até 31% desta classificação estar errada, bem como

na combinação das moléculas IBMP-8.1 e IBMP-8.3 (PP < 45%), pertencentes ao padrão de resposta P2 (Figura 13).

5.2.3 Obtenção dos painéis sorológicos

As amostras séricas que compuseram os painéis sorológicos foram cedidas por Instituições localizadas em diferentes estados brasileiros (Tabela 3). Assim, 2.012 amostras séricas foram admitidas no presente estudo. Deste quantitativo, 1.260 foram utilizadas no estudo de fase II e 752 foram utilizadas para avaliação de reatividade cruzada com outros patógenos de interesse veterinário. Das amostras incluídas no estudo de fase II, 275 foram provenientes da Bahia, 330 do Maranhão, 220 de Minas Gerais, 35 de Pernambuco, 59 do Rio de Janeiro, 80 do Rio Grande do Norte e 261 de Sergipe. Para a avaliação da reatividade cruzada, foram incluídas 752 amostras, sendo 115 provenientes de animais portadores de anaplasnose, 166 de babesiose, 76 de dirofilariose, 163 de erliquiose, 115 de leishmaniose visceral e 117 de leptospirose. Os diagnósticos para as referidas doenças foram realizados por técnicas moleculares, sorológicas e/ou parasitológicas pelas Instituições parceiras. Nenhuma avaliação adicional foi realizada nas amostras de reatividade cruzada além dos imunoenaios para a doença de Chagas.

Tabela 3 - Painéis sorológicos utilizados na avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos IBMP.

Estudo	Patologia	BA	MA	MG	PE	RJ	RN	SE	Total
Fase II	Doença de Chagas	54	48	66	35	10	12	1	226
	Negativas	221	282	154	-	49	68	260	1.034
TOTAL									1.260
Reatividade cruzada	Anaplasnose	-	-	-	115	-	-	-	115
	Babesiose	-	-	-	166	-	-	-	166
	Dirofilariose	-	-	-	76	-	-	-	76
	Erliquiose	-	-	-	163	-	-	-	163
	Leish. visceral	17	-	8	90	-	-	-	115
	Leptospirose	117	-	-	-	-	-	-	117
TOTAL									752
TOTAL GERAL*									2.012

Legenda: BA (Bahia); MA (Maranhão); MG (Minas Gerais); PE (Pernambuco); RJ (Rio de Janeiro); RN (Rio Grande do Norte); SE (Sergipe); Leish (Leishmaniose).

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.4 Caracterização do painel amostral

Conforme mencionando anteriormente, as amostras séricas que compuseram os painéis sorológicos foram cedidas por Instituições parceiras e encaminhadas ao LASP, onde foram classificadas como positivas ou negativas através da análise de classe latente (LCA; Figura 13). Das amostras que compuseram o estudo de fase II, 226/1.260 (17,9%) foram classificadas pela LCA como positivas para a DC e 1.034/1.260 (82,1%) como negativas (Figura 14). Os padrões de resposta para a LCA encontram-se descritos na Figura 14. Para tais amostras, 159 foram reativas para quatro (106/1.260; 8,41%) ou três moléculas (53/1.260; 4,21%), apresentando probabilidade *à posteriori* superior a 99% deste resultado estar correto, ou seja, de realmente serem positivas para DC. A reatividade para combinação de duas moléculas foi observada para 67 amostras (67/1.260; 5,32%), com probabilidade *à posteriori* variando de 68,7 a 98,4% de estarem classificadas corretamente como positivas para DC. Por outro lado, 888 amostras (888/1.260; 70,47%) não apresentaram reatividade para nenhuma das moléculas quiméricas do *T. cruzi*, com probabilidade *à posteriori* nula ($pp = 0\%$) destas amostras serem positivas para DC. Reatividade para somente uma molécula foi observada em 145 amostras (145/1.260; 11,51%) com baixa probabilidade (1,6 a 30,9%) destas amostras serem positivas. Por fim, somente uma amostra (1/1.260; 0,08%) apresentou reatividade para duas moléculas: IBMP-8.1 e IBMP-8.3; com probabilidade *à posteriori* inferior a 50% ($pp = 44,8\%$) desta amostra ser positiva para DC. Para as amostras positivas para outras doenças infecto-parasitárias que serão utilizadas no estudo de reatividade cruzada (Figura 14), foi observado que a maioria (634/752; 84,31%) não reagiu para nenhuma das quatro moléculas, 46/752 (6,12%) reagiram isoladamente para o antígeno IBMP-8.1, 9/752 (1,20%) para o IBMP-8.2, 41/752 (5,45%) para o IBMP-8.3 e 14/752 (1,86%) para o IBMP-8.4. A reatividade combinada para os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.3 foi demonstrada em 8 amostras (8/752; 1,06%). Todas as amostras utilizadas no estudo respeitaram os critérios de inclusão previamente estabelecidos.

ELISA	P1	P2				P3					P5				P4	
IBMP-8.1	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
IBMP-8.2	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
IBMP-8.3	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
IBMP-8.4	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
LCS	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
PP %	0,0	1,6	30,9	1,9	5,0	94,9	44,8	68,7	95,8	98,4	73,0	99,9	100	99,1	100	100

Estudo de Fase II																	
Doença de Chagas	n	888	96	36	9	4	29	1	1	8	20	9	9	12	12	20	106
Reatividade cruzada																	
Anaplasmosse	n	97	7	1	4	5	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Babesiose	n	140	7	1	14	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dirofilariose	n	63	5	1	1	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erlíquiose	n	138	6	1	14	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leishmaniose	n	104	3	4	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leptospirose	n	92	18	1	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	n	634	46	9	41	14	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL																	
Soroteca completa	N	1.522	142	45	50	18	29	9	1	8	20	9	9	12	12	20	106

Figura 14 - Classificação das amostras incluídas no estudo através da análise de classe latente.

Legenda: Neg (negativo), P (padrão), PP (probabilidade *à posteriori*), LCS (padrão de classe latente), Pos (positivo), n (número de amostras).

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS IBMP

5.3.1 Estudo de fase II

5.3.1.1 Desempenho global

Considerando os valores de AUC determinados para as amostras analisadas, os antígenos que apresentaram a maior capacidade discriminatória entre amostras positivas e negativas foram o IBMP-8.4 (AUC = 97,4%; IC95%: 96,0-98,9%), IBMP-8.3 (AUC = 97,1%; IC95%: 96,0-98,3%), IBMP-8.2 (AUC = 97,0%; IC95%: 95,8-98,2%), seguidos pelo IBMP-8.1 (AUC = 89,0%; IC95%: 86,8-91,2%) (Figura 15). Segundo a classificação proposta por Swets, em 1988, todas as quatro moléculas atingiram valores discriminatórios considerados elevados. Dada a sobreposição dos intervalos de confiança a 95% (IC95%), não houve diferença entre os valores encontrados para os antígenos IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4; todavia, os

três antígenos apresentaram valores de AUC superiores ao relatado para o IBMP-8.1 (Figura 16).

Do total de amostras positivas ($n = 226$), o antígeno IBMP-8.1 classificou 57 (25,2%) como falso-negativas, o IBMP-8.2, 22 (9,7%), o IBMP-8.3, 62 (27,4%) e o IBMP-8.4, 46 (20,4%), conferindo sensibilidades de 74,8% (IC95%: 68,7-80,0%), 90,3% (IC95%: 85,7-93,5%), 72,6% (IC95%: 66,4-78,0%) e 79,6% (IC95%: 73,9-84,4), respectivamente (Figura 15). Em virtude da ausência de sobreposição do IC95%, o IBMP-8.2 demonstrou sensibilidade superior ao encontrado para os demais antígenos, os quais não apresentaram diferença entre si (Figura 16). Quanto às amostras negativas ($n = 1.034$), 97 (9,4%), 36 (3,5%), 10 (1,0%) e 4 (0,4%) foram erroneamente identificadas como positivas quando avaliadas pelos antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4, com resultados de especificidade em 90,6% (IC95%: 88,7-92,2%), 96,5% (95,2-97,5%), 99,0% (IC95%: 98,2-99,5%) e 99,6% (IC95%: 99,0-99,8%), respectivamente. Pela análise do IC95%, os antígenos IBMP-8.3 e IBMP-8.4 apresentaram valores de especificidade superiores aos do IBMP-8.1 e IBMP-8.2; contudo não houve diferença entre IBMP-8.3 e IBMP-8.4 e entre IBMP-8.1 e IBMP-8.2 (Figura 16). Os antígenos IBMP-8.4, IBMP-8.2 e IBMP-8.3 foram os que classificaram corretamente o maior número de amostras analisadas, atingindo valores de 96,0% (IC95%: 94,8-97,0%), 95,4% (IC95%: 94,1-96,4%) e 94,3% (92,9-95,4%), respectivamente, sem diferença entre eles. Por outro lado, o IBMP-8.1 classificou, globalmente, 154 amostras (154/1.260; 12,2%) erroneamente, revelando uma acurácia de 87,8% (IC95%: 85,9-89,5%), com diferença estatística quando comparado aos demais antígenos.

O índice de *Kappa* de Cohen revelou concordância substancial ($\kappa = 0,61$; IBMP-8.1 e $\kappa = 0,79$; IBMP-8.3) e quase perfeita ($\kappa = 0,85$; IBMP-8.2 e $\kappa = 0,85$; IBMP-8.4). Os valores de *odds ratio* diagnóstico (DOR) foram obtidos a partir da verossimilhança positiva (LR+) e negativa (LR-). O maior valor encontrado foi para o IBMP-8.4 (~ 1.008 ; IC95%: 358-2.833), seguindo pelo IBMP-8.3 (~ 271 ; IC95%: 136-539), IBMP-8.2 (~ 257 ; IC95%: 148-446) e IBMP-8.1 (~ 29 ; IC95%: 20-41). Os valores de probabilidade pré e pós-teste também foram determinados e encontram-se disponíveis na Figura 15.

Dentre as amostras positivas, os antígenos que apresentaram as maiores médias geométricas foram o IBMP-8.2 (IR = $1,51 \pm 0,09$) e o IBMP-8.3 (IR = $1,37 \pm 0,11$), seguidos pelo IBMP-8.4 (IR = $1,35 \pm 0,10$) e IBMP-8.1 (IR = $1,27 \pm 0,08$) (Figura 15). Para as amostras negativas, o IBMP-8.4 (IR = $0,33 \pm 0,02$) e o IBMP-8.3 (IR = $0,34 \pm 0,01$) apresentaram os menores sinais de reatividade, seguidos pelo IBMP-8.2 (IR = $0,37 \pm 0,02$) e IBMP-8.1 (IR =

0,44 ± 0,02). O IBMP-8.1 apresentou o maior quantitativo amostral na zona cinza (n = 82; 6,5%), seguindo pelo IBMP-8.2 (n = 78; 6,2%), IBMP-8.4 (n = 58; 4,6%) e IBMP-8.3 (n = 51; 4,0%).

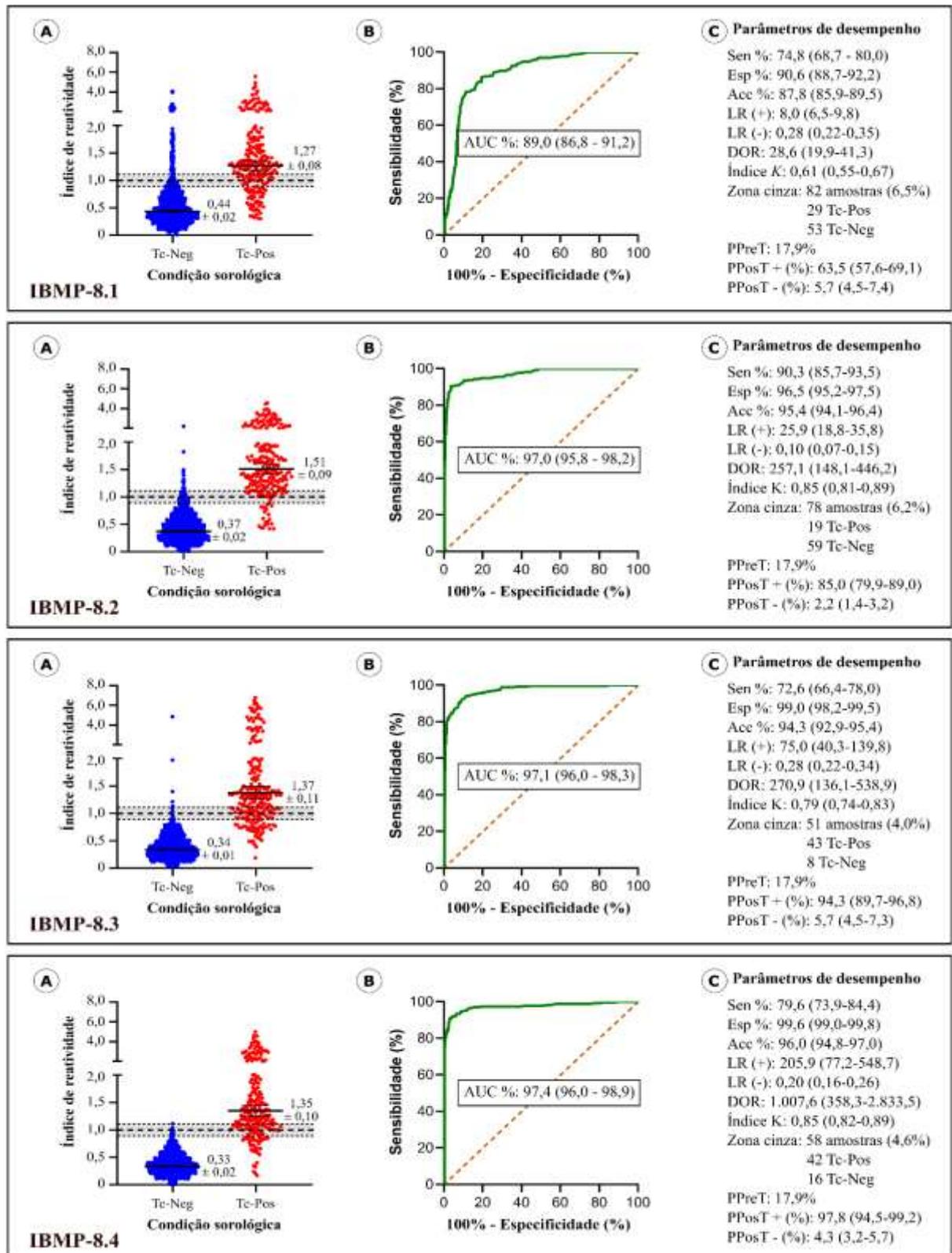


Figura 15 - Representação gráfica dos índices de reatividade dos antígenos IBMP no estudo de fase II (A), suas respectivas curvas ROC (B) e parâmetros de desempenho diagnóstico (C).

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

Legenda: Tc-Neg (Amostras negativas para *Trypanosoma cruzi*); Tc-Pos (Amostras positivas para *T. cruzi*); AUC (Área abaixo da curva ROC); Sen (Sensibilidade); Esp (especificidade); Acc

(Acurácia); LR (+) (Razão de verossimilhança positiva); LR (-) (Razão de verossimilhança negativa); DOR (*Odds ratio* diagnóstico); k (Índice de Kappa de Cohen); PPreT (Probabilidade pré-teste); PPosT + (Probabilidade pós-teste positiva); PPosT - (Probabilidade pós-teste negativa).

Fonte: Elaborado pela autora.

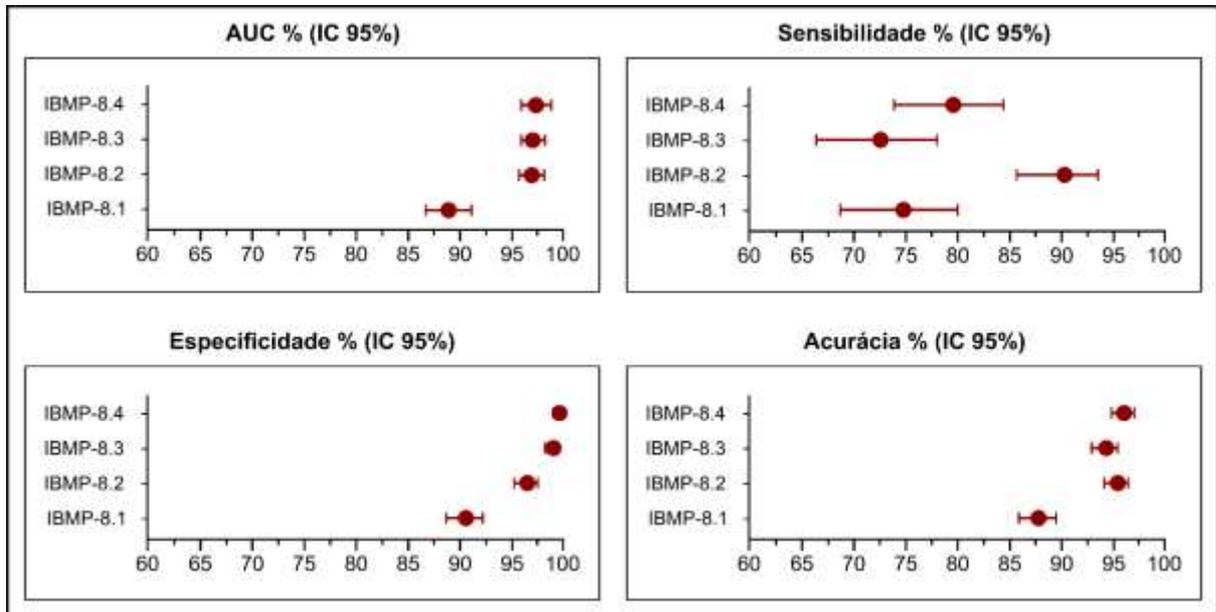


Figura 16 - Representação gráfica dos intervalos de confiança a 95% (IC95%) da AUC, sensibilidade, especificidade e acurácia, determinados para os antígenos IBMP.

Legenda: AUC (Área abaixo da curva ROC).

Fonte: Elaborado pela autora.

Além do desempenho individual de cada molécula, foi analisado o desempenho diagnóstico em série e em paralelo empregando combinações de dois antígenos IBMP (Tabela 4). De acordo com o esquema em série, a sensibilidade variou de 54,3% a 71,9%, enquanto a especificidade alcançou valores que variaram de 99,7% a 100%. Quanto à acurácia, os valores variaram de 91,7% para a combinação IBMP-8.1/IBMP-8.3 a 94,9% para a dupla IBMP-8.2/IBMP-8.4. Por outro lado, os valores de sensibilidade variaram de 93,1% a 98,0% utilizando o esquema em paralelo. O valor máximo de sensibilidade foi alcançado através do uso combinado das moléculas IBMP-8.2 + IBMP-8.4. No entanto, devido à sobreposição dos valores de IC95%, não houve diferença significativa da sensibilidade para qualquer combinação usando o esquema em paralelo, exceto entre as duplas IBMP-8.1/IBMP-8.2 e IBMP-8.2/IBMP-8.4. Ainda considerando o esquema em paralelo, foi observado que, independentemente do conjunto de antígenos usados, os valores de acurácia foram superiores ou iguais a 89,2%, com valor máximo de 97,9% usando os pares IBMP-8.1/IBMP-8.2 e IBMP-8.3/IBMP-8.4. Todavia, dada a sobreposição dos IC95%, não houve diferença significativa entre os valores de acurácia.

Tabela 4 - Análise do desempenho diagnóstico das proteínas quiméricas IBMP considerando as análises em série e em paralelo.

Par de testes	SEN	ESP	ACC
Séries	% (IC 95%)	% (IC 95%)	% (IC 95%)
IBMP-8.1 / IBMP-8.2	67,5 (58,9-74,8)	99,7 (99,5-99,8)	93,9 (92,2-95,3)
IBMP-8.1 / IBMP-8.3	54,3 (45,6-62,4)	99,9 (99,8-100)	91,7 (90,1-93,2)
IBMP-8.1 / IBMP-8.4	59,5 (50,8-67,5)	100 (99,9-100)	92,7 (91,1-94,2)
IBMP-8.2 / IBMP-8.3	65,6 (56,9-72,9)	100 (99,9-100)	93,8 (92,2-95,1)
IBMP-8.2 / IBMP-8.4	71,9 (63,3-78,9)	100 (99,9-100)	94,9 (93,3-96,2)
IBMP-8.3 / IBMP-8.4	57,8 (49,1-65,8)	100 (99,9-100)	92,4 (90,9-93,9)
Paralelo	% (IC 95%)	% (IC 95%)	% (IC 95%)
IBMP-8.1 / IBMP-8.2	97,6 (95,5-98,7)	87,4 (84,4-89,9)	89,2 (86,4-91,5)
IBMP-8.1 / IBMP-8.3	93,1 (89,5-95,6)	89,7 (87,1-91,7)	90,3 (87,5-92,4)
IBMP-8.1 / IBMP-8.4	94,9 (91,8-96,9)	90,2 (87,8-92,0)	91,1 (88,5-92,9)
IBMP-8.2 / IBMP-8.3	97,3 (95,2-98,6)	95,5 (93,5-97,0)	95,9 (93,8-97,3)
IBMP-8.2 / IBMP-8.4	98,0 (96,3-99,0)	96,1 (94,2-97,3)	96,4 (94,6-97,6)
IBMP-8.3 / IBMP-8.4	94,4 (91,2-96,6)	98,6 (97,2-99,3)	97,9 (96,1-98,8)

Legenda: SEN (Sensibilidade); ESP (Especificidade); ACC (Acurácia); IC (Intervalo de confiança).

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.1.2 Desempenho por área geográfica

Dada a variabilidade genética do *T. cruzi*, as amostras positivas foram estratificadas de acordo com localidade de origem com objetivo de analisar a magnitude de resposta humoral aos antígenos IBMP por cães infectados de diferentes regiões geográficas do Brasil (Figura 17). A análise gráfica mostra que a molécula IBMP-8.1 foi reconhecida por amostras de todas as localidades, sem diferença de sinal entre elas. Por outro lado, para as moléculas IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 o sinal variou quando algumas regiões geográficas foram comparadas com as demais. As diferenças significativas estão grifadas em **negrito vermelho** na Figura 17.

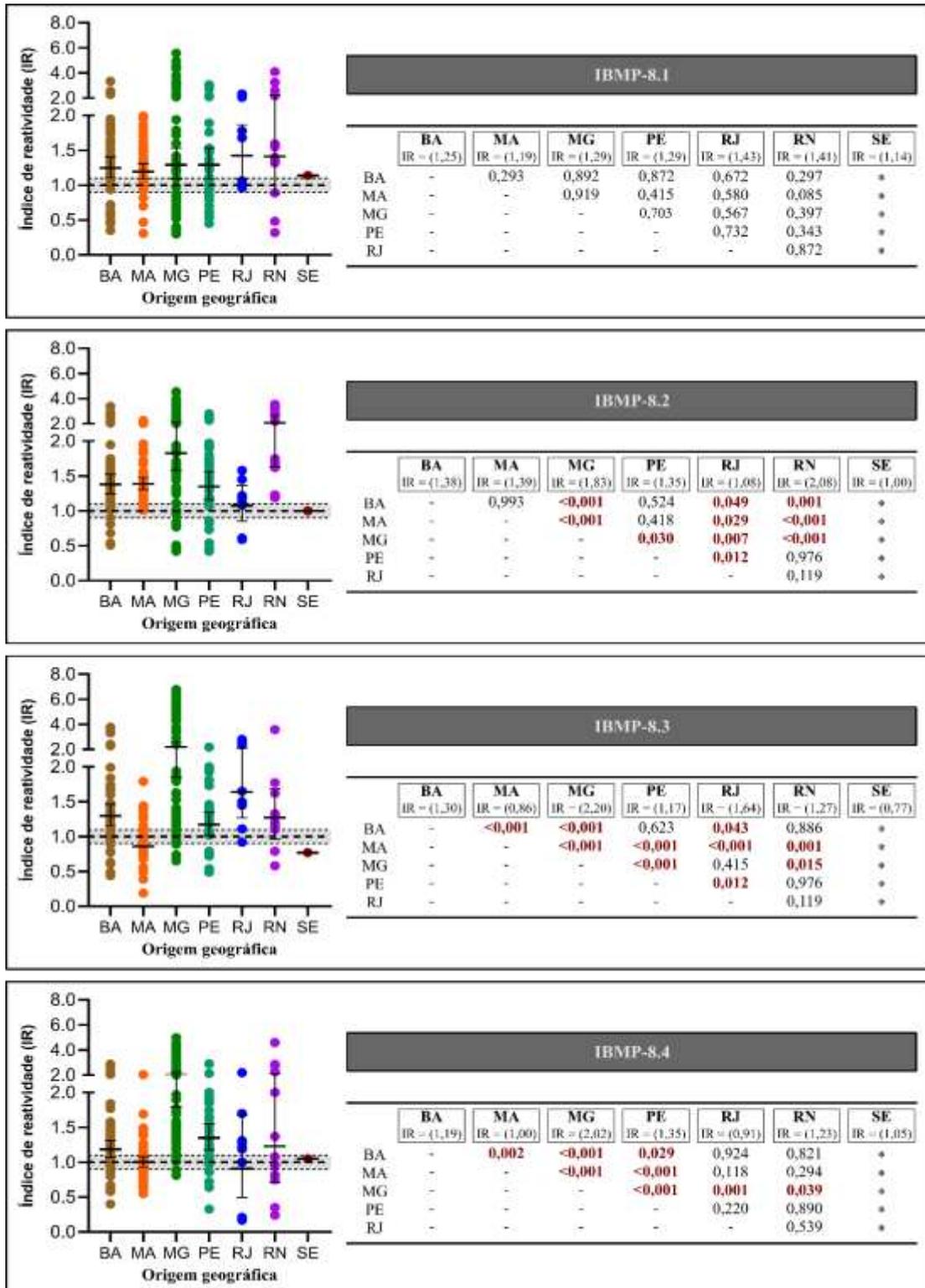


Figura 17 - Análise gráfica dos índices de reatividade das amostras de cães positivos para DC estratificadas por região geográfica utilizando os antígenos IBMP.

Nota: *Não foi possível comparar os resultados de SE com os demais estados devido ao quantitativo de amostras positivas encontradas nesta localidade ser igual a um ($n = 1$). Valores de p significativos estão grifados em vermelho. Índice de reatividade igual a 1,00 representam o ponto de corte nas representações gráficas.

Legenda: BA (Bahia); IR (índice de reatividade); MA (Maranhão); MG (Minas Gerais); PE (Pernambuco); RJ (Rio de Janeiro); RN (Rio Grande do Norte); SE (Sergipe).

Fonte: Elaborado pela autora.

Conforme descrito na Tabela 5, os principais parâmetros de desempenho diagnóstico foram determinados com o objetivo de verificar a magnitude de resposta aos antígenos IBMP por cães portadores e não portadores da DC provenientes de diferentes localidades do Brasil.

Tabela 5 - Parâmetros de desempenho do IBMP estratificados por origem ou região geográfica na fase II do estudo.

IBMP	AUC (IC95%)	Sen (%) (IC95%)	Esp (%) (IC95%)	Acc (%) (IC95%)	
BA	8.1	84,2 (79,2-89,2)	81,5 (69,2-89,6)	81,9 (76,3-86,4)	81,8 (76,8-85,9)
	8.2	98,8 (95,5-100)	90,7 (80,1-96,0)	99,1 (96,8-99,8)	97,5 (94,8-98,8)
	8.3	98,8 (97,6-99,9)	79,6 (67,1-88,2)	99,1 (96,8-99,8)	95,3 (92,1-97,2)
	8.4	98,8 (97,3-100)	79,6 (67,1-88,2)	100 (98,3-100)	96,0 (93,0-97,8)
MA	8.1	92,1 (87,3-96,9)	87,5 (75,3-94,1)	93,6 (90,1-95,9)	92,7 (89,4-95,1)
	8.2	98,3 (97,1-99,4)	100 (92,6-100)	91,1 (87,2-93,9)	92,4 (89,1-94,8)
	8.3	94,3 (89,9-98,8)	33,3 (21,7-47,5)	99,3 (97,5-99,8)	89,7 (85,9-92,5)
	8.4	97,3 (95,5-99,0)	56,3 (42,3-69,3)	99,6 (98,0-99,9)	93,3 (90,1-95,6)
MG	8.1	84,8 (79,2-90,4)	60,0 (47,9-71,0)	94,2 (89,3-96,9)	84,0 (78,6-88,3)
	8.2	97,5 (95,8-99,3)	86,4 (76,1-92,7)	96,1 (91,8-98,2)	93,2 (89,1-95,8)
	8.3	97,7 (95,6-99,9)	90,9 (81,6-95,8)	98,7 (95,4-99,6)	96,4 (93,0-98,1)
	8.4	99,7 (99,4-100)	97,0 (89,6-99,2)	98,7 (95,4-99,6)	98,2 (95,4-99,3)
PE*	8.1	-	74,3 (57,9-85,8)	-	-
	8.2	-	82,9 (67,3-91,9)	-	-
	8.3	-	82,9 (67,3-91,9)	-	-
	8.4	-	85,7 (70,6-93,7)	-	-
RJ	8.1	97,9 (94,6-100)	80,0 (49,0-94,3)	95,9 (86,3-98,9)	93,2 (83,8-97,3)
	8.2	96,2 (90,9-100)	80,0 (49,0-94,3)	100 (92,7-100)	96,6 (88,5-99,1)
	8.3	97,8 (94,3-100)	90,0 (59,6-98,2)	91,8 (80,8-96,8)	91,5 (81,6-96,3)
	8.4	82,0 (59,7-100)	80,0 (49,0-94,3)	100 (92,7-100)	96,6 (88,5-99,1)
RN	8.1	86,1 (75,4-96,8)	75,0 (46,8-91,1)	85,3 (75,0-91,8)	83,8 (74,2-90,3)
	8.2	99,0 (97,3-100)	100 (75,7-100)	97,1 (89,9-99,2)	97,5 (91,3-99,3)
	8.3	97,4 (92,6-100)	83,3 (55,2-95,3)	100 (94,7-100)	97,5 (91,3-99,3)
	8.4	94,4 (86,5-100)	58,3 (32,0-80,7)	100 (94,7-100)	93,8 (86,2-97,3)
SE**	8.1	-	-	-	-
	8.2	-	-	-	-
	8.3	-	-	-	-
	8.4	-	-	-	-

*PE: análise realizada somente em amostras positivas, nenhuma das amostras analisadas foi classificada como negativa pela LCA; **SE: análise não realizada dado ao baixo quantitativo de amostras positivas (n = 1) classificadas pela LCA.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.2 Estudo de reatividade cruzada

A avaliação gráfica das reações cruzadas está descrita na Figura 18. Do total de 752 amostras séricas de cães portadores de outras doenças infecto-parasitárias, foi observada

reatividade para 7,2% (54/752) para o IBMP-8.1 (anaplasrose: 8; babesiose: 10; dirofilariose: 5; erliquiose: 9; leishmaniose: 4; leptospirose: 18), 0,9% (7/752) para o IBMP-8.2 (anaplasrose: 1; babesiose: 1; dirofilariose: 1; erliquiose: 1; leishmaniose: 4; leptospirose: 1), 6,5% (49/752) para o IBMP-8.3 (anaplasrose: 5; babesiose: 17; dirofilariose: 1; erliquiose: 17; leishmaniose: 3; leptospirose: 6) e 1,9% (14/752) para o IBMP-8.4 (anaplasrose: 5; babesiose: 1; dirofilariose: 6; erliquiose: 1; leishmaniose: 1). Ao considerar a faixa do IR = $1,0 \pm 10\%$ como a zona cinza foi observado que 3,9% (29/752) das amostras apresentaram resultados inconclusivos para o IBMP-8.1, 1,7% (13/752) para o IBMP-8.2, 5,7% (43/752) para o IBMP-8.3 e 4,3% (32/752) para o IBMP-8.4. De modo geral, as moléculas IBMP-8.1 e IBMP-8.3 foram as que apresentaram os maiores índices de reatividade para a maioria das doenças infeto-parasitárias avaliadas. Este fato deve-se a maior reatividade observada para algumas amostras, em especial para a leptospirose.

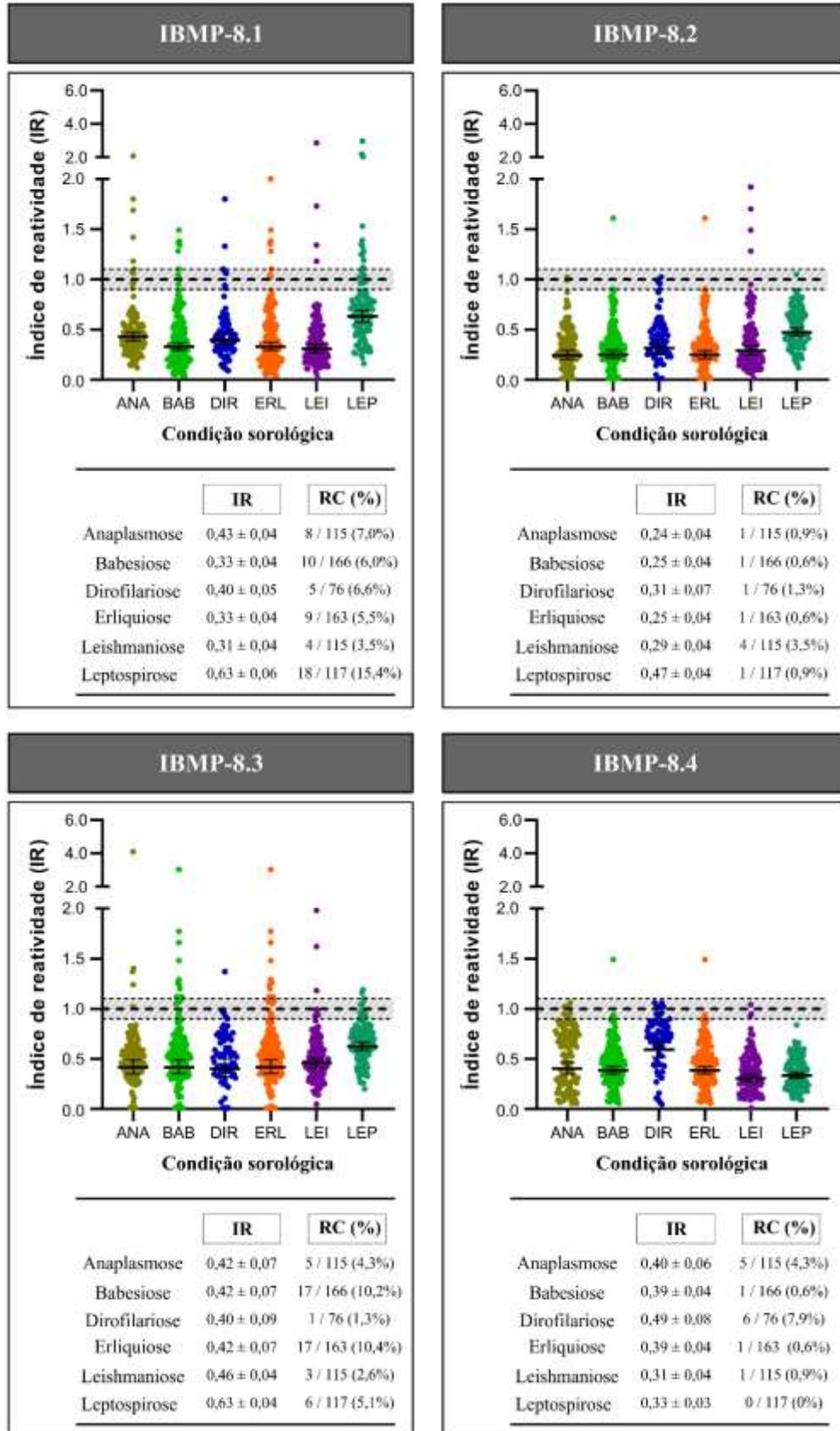


Figura 18 - Análise gráfica da reatividade cruzada dos antígenos IBMP com soro de cães portadores de outras doenças.

Nota: A área sombreada representa a zona cinza (IR = 1,0 ± 10%).

Legenda: ANA (Anaplasmoze); BAB (Babesioze); DIR (Dirofilarioze); ERL (Erlíquioze); LEI (Leishmanioze visceral); IR (Índice de reatividade); RC (Reação cruzada).

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.3 Concordância de desempenho com kits comerciais adaptados

A avaliação do painel sorológico utilizando o kit comercial Gold Elisa Chagas, adaptado para diagnóstico laboratorial da DC canina (LEONY *et al.*, 2019), mostrou sensibilidade de 62,3% (54,5%-69,9%), especificidade de 98,6% (97,1%-99,3%) e acurácia de 89,9% (87,3%-92,0%). O valor de AUC foi elevado (94,3%) e o DOR apresentou valor de 114,2. Demais parâmetros de desempenho, bem como os índices de reatividade médios para amostras positivas e negativas podem ser visualizados diretamente na Figura 19. Os valores médios dos IR para as amostras positivas e negativas foram 1,24 e 0,30, respectivamente. O IR encontrado para as amostras oriundas de Minas Gerais foram superiores àquele encontrado para as amostras dos demais estados analisados. Na análise da reatividade cruzada, um total de 40 amostras foram erroneamente consideradas como positivas, sendo 13 verdadeiramente positivas para anaplasmoze, 5 amostras de babesioze, 13 de dirofilarioze, 5 de erliquioze, 3 de leishmanioze e 1 de leptospirose. A Figura 20 apresenta um gráfico de sensibilidade *versus* especificidade no qual podem ser visualizados os parâmetros de desempenho dos IBMP e do Gold Elisa Chagas.

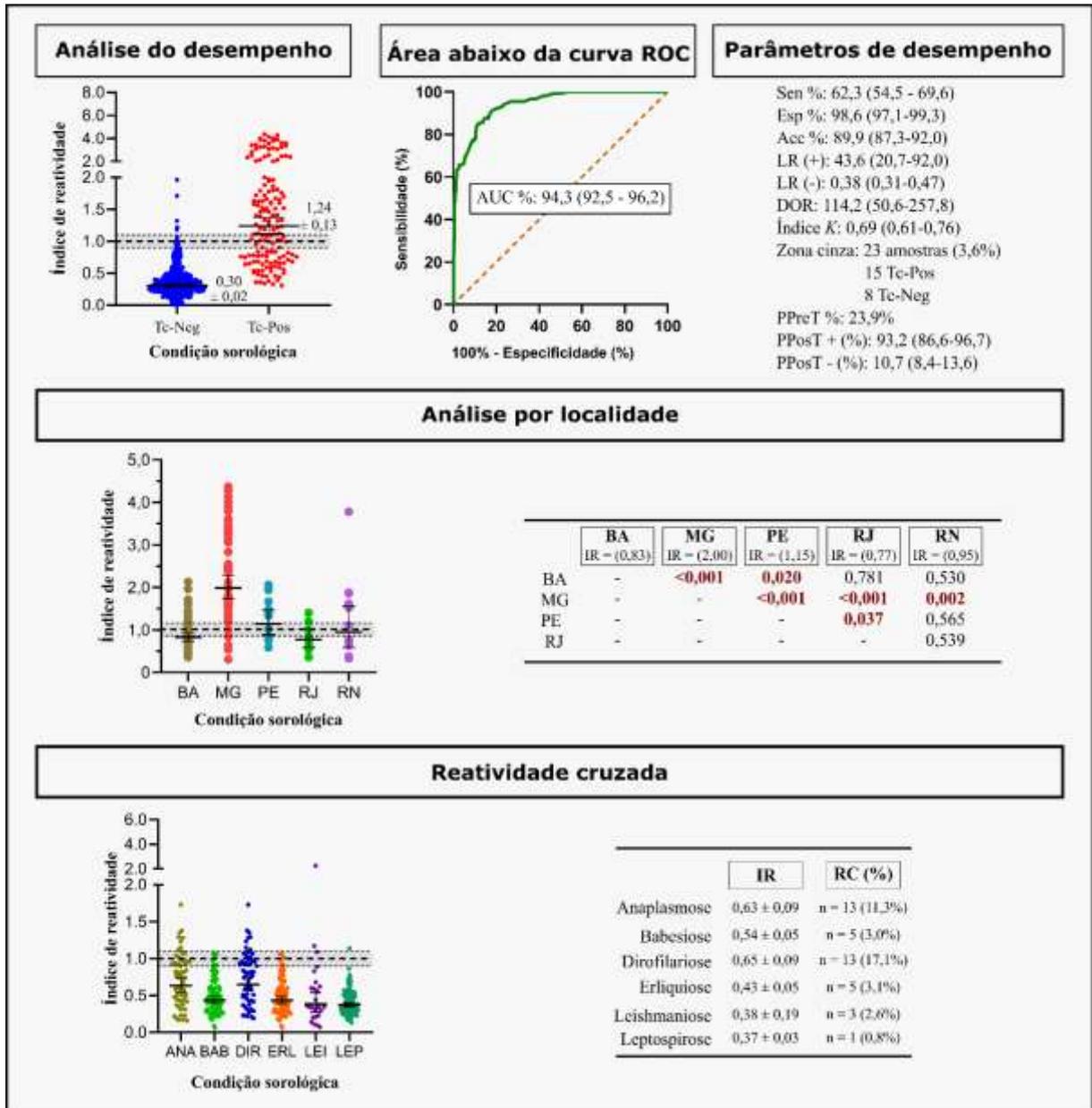


Figura 19 - Análise do desempenho diagnóstico do teste comercial Gold ELISA Chagas (REM Diagnóstica, Brasil) adaptado para diagnóstico da doença de Chagas em cães.

Nota: As áreas sombreadas representam a zona cinza ($IR \pm 10\%$).

Legenda: Tc-Neg (Amostras negativas para *Trypanosoma cruzi*); Tc-Pos (Amostras positivas para *T. cruzi*); AUC (Área abaixo da curva ROC); Sen (Sensibilidade); Esp (especificidade); ACC (Acurácia); LR (+) (Razão de verossimilhança positiva); LR (-) (Razão de verossimilhança negativa); DOR (Odds ratio diagnóstico); k (Índice de Kappa de Cohen); PPreT (Probabilidade pré-teste); PPosT + (Probabilidade pós-teste positiva); PPosT - (Probabilidade pós-teste negativa); ANA (Anaplasmosse); BAB (Babesiose); DIR (Dirofilariose); ERL (Erlíquiose); LEI (Leishmaniose visceral); LEP (Leptospirose); IR (Índice de reatividade); RC (Reação cruzada). BA (Bahia); MG (Minas Gerais); PE (Pernambuco); RJ (Rio de Janeiro); RN (Rio Grande do Norte).

Fonte: Elaborado pela autora.

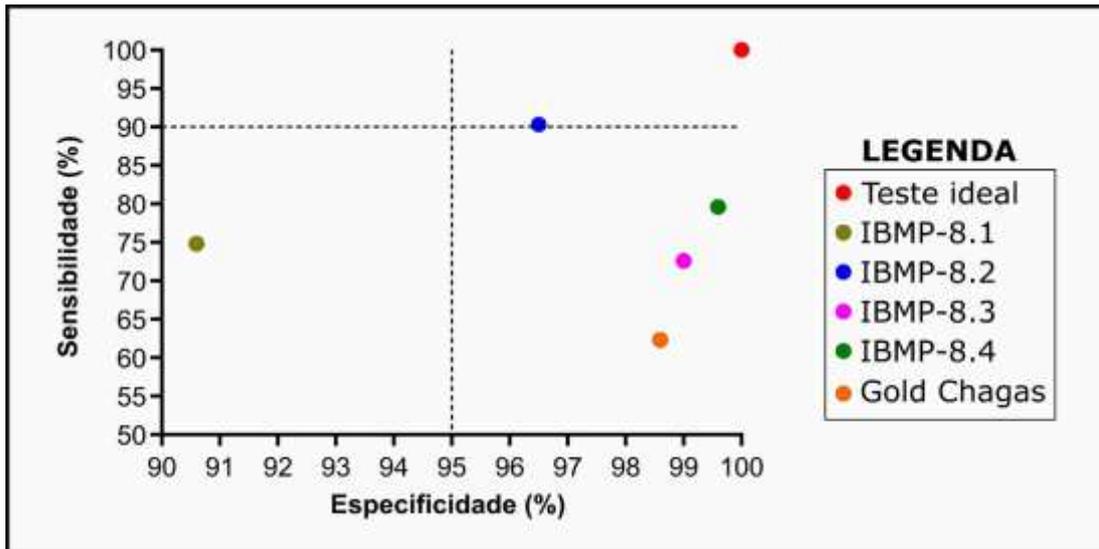


Figura 20 - Classificação dos IBMP e do Gold Chagas ELISA quanto aos parâmetros de desempenho.

Nota: O ponto vermelho representa um teste ideal com 90% de sensibilidade e 95% de especificidade.

Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Os cães são os principais reservatórios do *Trypanosoma cruzi* no ciclo doméstico da DC e, quando infectados, podem desenvolver sinais clínicos graves e patogenia semelhantes aos descritos para humanos, motivo pelo qual são utilizados como modelo experimental para esta enfermidade (TORRES; VILLAÇA, 1919; GÜRTLER; CARDINAL, 2015). Apesar da sua importância epidemiológica, até os dias atuais não existe um teste comercial voltado ao diagnóstico da infecção causada pelo *T. cruzi* nestes animais, fato que torna um desafio a interrupção do ciclo de transmissão, combate e controle da doença. O diagnóstico da DC canina, assim como a humana, é desafiador, pois o desempenho dos testes utilizados é condicionado a diversas variáveis, como a preparação antigênica utilizada na sensibilização da fase sólida, polimorfismo genético do parasita, possibilidade de reações cruzadas, bem como a escolha da plataforma diagnóstica adotada (VEGA BENEDETTI et al., 2013; BRENIÈRE et al., 2016; DIAS et al, 2016).

Com o intuito de elevar os parâmetros de desempenho dos imunoenaios utilizados para o diagnóstico da DC humana, diversos autores avaliaram a utilização antígenos recombinantes quiméricos para a identificação de anticorpos anti-*T. cruzi*, e obtiveram resultados animadores (CAMUSSONE et al., 2009; HOUGHTON et al., 1999; PEVERENGO et al., 2018). Tais moléculas são constituídas por epítomos conservados e repetitivos de diversas proteínas do *T. cruzi*, conferindo a elas alta capacidade diagnóstica devido ao seu repertório diversificado de epítomos. Seguindo esta linha de raciocínio, nosso grupo desenvolveu quatro antígenos quiméricos (IBPP-8.1 a IBMP-8.4), os quais foram avaliados para o diagnóstico da infecção em humanos e apresentaram desempenho superior aos kits comerciais disponíveis no Brasil (SANTOS et al., 2016a; SANTOS et al., 2017a). Devido aos resultados observados para humanos, o potencial diagnóstico das moléculas IBMP foi também explorado em um estudo de fase I para a identificação da DC canina (LEONY et al., 2019). Naquela ocasião, devido aos elevados valores de AUC encontrados, foi comprovada a capacidade que as moléculas possuem de diferenciar amostras séricas de cães negativos para a DC de amostras de animais infectados com distintas cepas do *T. cruzi*. A determinação preliminar dos valores de sensibilidade e especificidade nos motivou a realizar um estudo de fase II, cujos resultados seguem abaixo.

6.1 CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL

Apesar de ser uma enfermidade com amplo impacto na saúde pública em 21 países endêmicos da América Latina, e mais recentemente em países indenes da América do Norte, Europa, Ásia e Oceania, a DC ainda é considerada uma doença negligenciada (CASULLI, 2021). A descrição do *T. cruzi* ocorreu em 1909 e muitos avanços no entendimento da doença ocorreram nestes últimos 112 anos. Todavia, ainda há lacunas e obstáculos que precisam ser superados, sobretudo em relação ao tratamento e diagnóstico laboratorial. De fato, até os dias atuais inexistem testes de referência (padrão ouro) para o diagnóstico da doença em sua fase crônica. Por este motivo, e com objetivo de aumentar a confiabilidade dos resultados, a OMS recomenda a utilização em paralelo de dois testes diagnósticos para a identificação da DC humana; a combinação dos resultados obtidos define o perfil sorológico dos indivíduos. Em caso de discordância, o resultado é considerado inconclusivo, necessitando de um terceiro teste para elucidação diagnóstica (WHO, 2002). Quando o pensamento se volta para a identificação da DC canina, as limitações são ainda maiores. Para esta finalidade, são utilizados testes *in house* padronizados por diferentes grupos de pesquisa, utilizando diferentes preparações antigênicas e plataformas diagnósticas variadas, o que dificulta a reprodutibilidade dos ensaios e torna inviável a comparação dos dados disponíveis na literatura. Devido à ausência de um teste comercial para definição do perfil sorológico das amostras de cães utilizadas no presente estudo, optamos por utilizar a análise de classe latente (LCA). Trata-se de uma modelagem matemática que identifica distintos grupos (classes latentes) com base nos padrões de respostas observadas em duas ou mais variáveis categóricas (Collins e Lanza, 2010). De fato, a probabilidade de uma dada combinação de resultados ou testes produz um padrão de classe latente, isto é, o *status* de doença, se presente ou ausente (KONGSTED, A; NIELSEN, A.M., 2016). Neste estudo, uma parte das amostras foi testada individualmente para as quatro moléculas IBMP, e a análise combinada dos resultados foi utilizada para definir as amostras do painel sorológico como positivas ou negativas, de acordo com probabilidades, tornando a classificação o mais verossímil possível (BOELAERT *et al.*, 1999). Assim, através da LCA o painel amostral foi composto por 226 amostras positivas para DC e 1.034 amostras negativas, as quais foram utilizadas para a realização do estudo de fase II.

6.2 ESTUDO DE FASE II

O estudo de fase II consiste na avaliação de um método diagnóstico a partir de condições de análise bem controladas, com determinações mais precisas dos critérios de desempenho e utilização de amostras séricas representativas do agravo, independentemente da fase da doença e que sejam provenientes de áreas endêmicas e não endêmicas para o agravo em estudo (SANTOS, 2017). Diferentemente do estudo de fase I, em que se utiliza uma amostra de conveniência para distinção entre positivos e negativos (prova conceito), a fase II necessita de uma determinação estatística prévia para consolidação do total de amostras a serem analisadas.

No presente estudo, os quatro antígenos IBMP apresentaram valores de AUC superiores à 89,0%, com variação entre 89,0-97,4%, o que indica uma elevada capacidade diagnóstica e de distinção entre as amostras positivas e negativas. Ao se comparar com os resultados dispostos no estudo de fase I, conduzido em 2019, observou-se que os valores de AUC sofreram discreto declínio, em que anteriormente os resultados variaram entre 91,2-100% (LEONY *et al.*, 2019). Contudo, foi possível considerar que os antígenos IBMP mantiveram elevado desempenho diagnóstico em todo painel sorológico avaliado. Assim como encontrado previamente, o antígeno com maior capacidade discriminatória foi o IBMP-8.4 com 97,4%, seguido do IBMP-8.3 com 97,1%, IBMP-8.2 com 97,0% e por fim o antígeno IBMP-8.1 com 89,0%. Todavia os três primeiros antígenos não apresentaram diferença estatisticamente significativa, enquanto que o IBMP-8.1 foi novamente a molécula com menor poder discriminatório. Ao se comparar os resultados com os que já foram reportados por nosso grupo, observou-se que o uso dos antígenos IBMP para diagnóstico humano promoveu um maior valor de AUC, que variou de 99,14% a 99,55% (SANTOS *et al.*, 2016b). Tal divergência pode ser justificada pelas diferenças inerentes à cada espécie analisada, em que se inclui as diferenças físico-químicas dos anticorpos humanos e caninos, bem como a produção de autoanticorpos que dificultam o desempenho do diagnóstico sorológico em cães.

Em relação a sensibilidade, foi observado uma variação de 72,6-90,3%, sendo a molécula IBMP-8.2 a que apresentou desempenho superior às demais. Este achado contrapõe com o que foi encontrado no estudo de fase I, em que relatou a IBMP-8.3 como a molécula com maior capacidade de diagnosticar corretamente as amostras positivas para o *T. cruzi*. A inclusão de novas amostras no painel sérico, inserção de diferentes cepas, variação geográfica e composição dos antígenos podem justificar a variação no reconhecimento dos anticorpos específicos do *T. cruzi* e interferência na sensibilidade dos ensaios (VERANI *et al.*, 2009). Em

humanos, ao se utilizar os antígenos quiméricos no ELISA indireto, foi alcançado uma sensibilidade global superior. No entanto, como revelado na análise em paralelo, ao utilizar dois antígenos em conjunto, ocorreu um incremento da sensibilidade, sobretudo com as duplas IBMP-8.2/IBMP-8.4 e IBMP-8.1/IBMP-8.2, tornando este tipo de combinação de antígenos, ao se analisar com os demais parâmetros de desempenho, uma alternativa interessante para ferramenta diagnóstica que visa a execução de triagem. Por outro lado, o uso do esquema em série não contribuiu com elevação dos valores de sensibilidade, e por este motivo a aplicabilidade da análise em série deve ser desencorajada para o diagnóstico da DC em cães. As características intrínsecas das moléculas IBMP favorecem o aumento da sensibilidade de um teste diagnóstico, já que promovem sensibilização homogênea, ou seja, apenas uma pequena porção da molécula fica comprometida a se ligar à microplaca. Com isso, os demais epítomos permanecem disponíveis para reagir com os anticorpos específicos, proporcionando uma sensibilização homogênea da fase sólida e possibilitando aumento da reprodutibilidade dos imunoenaios. Dessa forma, há maior disponibilidade de sítios ativos livres em comparação com as demais preparações antigênicas, aumentando a sensibilidade dos testes (BELLUZO et al., 2011; CAMUSSONE et al., 2009; GONZALEZ et al., 2010).

Os antígenos IBMP alcançaram elevados valores de especificidade, com variação entre 90,6-99,6%. Particularmente, as moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4 foram as que apresentaram os maiores índices e, portanto, foram as que tiveram menor quantitativo de amostras negativas detectadas erroneamente como positivas. Em comparação com os resultados da fase I, observou-se que a especificidade manteve um padrão de desempenho elevado, e assim como descrito anteriormente a IBMP-8.3 obteve maior destaque com relação a este parâmetro (LEONY *et al.*, 2019). Na análise em paralelo, ao utilizar as combinações de antígenos, observou-se que o par IBMP-8.3 e IBMP-8.4 foi o que alcançou o maior índice de especificidade. Desta forma, infere-se que a utilização conjunta destas moléculas pode apresentar boa aplicabilidade em plataformas diagnósticas, sobretudo com o objetivo de testes confirmatórios, demonstrando que de forma geral as misturas equimolares utilizando os antígenos IBMP, podem através do aumento do repertório dos epítomos disponíveis elevar também o desempenho do ensaio (CAMUSSONE et al., 2009).

A acurácia, ou seja, a precisão diagnóstica e a capacidade das moléculas IBMP em fornecer resultados corretos, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as moléculas IBMP-8.4, IBMP-8.2 e IBMP-8.3. No presente estudo, a IBMP-8.1 foi a que mais classificou globalmente as amostras de forma incorreta, alcançando o menor índice de acurácia.

No estudo em humanos, o antígeno que apresentou melhor exatidão foi o IBMP-8.4 (99,3%), seguido pelo IBMP-8.3 (97,8%), IBMP-8.1 (96,9%) e IBMP-8.2 (93,8%) (SANTOS *et al.*, 2016b). Ao analisar conjuntamente os parâmetros de desempenho individuais de cada molécula, observou-se que a IBMP-8.1 apesar de apresentar alto potencial diagnóstico em humanos foi a que obteve menor desempenho para o diagnóstico em cães, com menores índices de sensibilidade, especificidade, acurácia, AUC e DOR. Esta divergência pode ser ocasionada pela variação da composição dos anticorpos humanos e caninos (STEINIGER *et al.*, 2014), e/ou devido a composição do antígeno quimérico IBMP-8.1 ser mais simples, com menor peso molecular (17 kDa) e menor variedade de epítomos para reação com uma maior diversidade de anticorpos específicos.

O *odds ratio* diagnóstico, refere-se a uma combinação estatística dos parâmetros de sensibilidade, especificidade e dos valores de verossimilhança positiva e negativa, aplicado em estudos de validação diagnóstica com o intuito de medir estatisticamente o desempenho global de um teste (SOUSA; RIBEIRO, 2009). Assim, encontrou-se para a molécula IBMP-8.1 valor de 28,6, para IBMP-8.2 257,1, para a IBMP-8.3 270,9 e para a molécula IBMP-8.4 1.007,6, sendo esta última a molécula que obteve melhor desempenho para o diagnóstico da doença de Chagas na espécie canina.

Ao se analisar o desempenho diagnóstico dos antígenos quiméricos em relação a origem geográfica das amostras séricas caninas, observou-se que a molécula IBMP-8.1 foi a única que não apresentou distinção do índice de reatividade de acordo ao estado que as amostras foram oriundas. As demais moléculas apresentaram diferença no sinal de reatividade ao se comparar diferentes localidades, porém ainda assim mantiveram índices seguros para discriminação entre amostras positivas e negativas, demonstrando a capacidade de serem reconhecidas em diversas regiões, apesar da intensa variabilidade genética do *T. cruzi*. Ainda neste estudo, fez-se a análise do parâmetro de desempenho individual de cada molécula de acordo ao estado de origem, e a partir da observação dos valores de AUC, sensibilidade, especificidade e acurácia, foi observado que algumas moléculas apresentavam melhor performance em determinados estados. A molécula IBMP-8.4 quando utilizada no diagnóstico das amostras oriundas do estado de Minas Gerais apresentou uma média de acurácia de 98,2%, enquanto que com as amostras do Maranhão decaiu a acurácia para 93,3%. Este achado reafirma a necessidade de se analisar e ter como perspectiva o uso combinado de antígenos no diagnóstico para que seja possível garantir a estabilidade do desempenho das moléculas IBMP, independentemente de onde seja aplicado a plataforma diagnóstica.

6.3 ESTUDO DE REATIVIDADE CRUZADA

Considerando um total de 752 amostras para análise de reatividade cruzada das amostras caninas com doenças não relacionadas, foi observado que a molécula IBMP-8.1 reagiu com 7,2% da população de outras doenças infecto-parasitárias, a IBMP-8.2 com 0,9%, a IBMP-8.3 com 6,5% e a IBMP-8.4 com 1,9%. As IBMP-8.2 e IBMP-8.4 apresentaram melhor desempenho, sugerindo que estas duas moléculas podem ser preconizadas para diagnóstico da infecção por *T. cruzi* em regiões de co-endemicidade. Por outro lado, a IBMP-8.1, assim como descrito no estudo de fase I, foi a molécula que obteve maior índice de reatividade cruzada, e afim de evitar falhas diagnósticas não é recomendada a sua utilização não combinada em inquéritos epidemiológicos, bem como na rotina clínica de áreas que apresentam co-endemicidade (LEONY *et al.*, 2019).

É disposto na literatura que um dos principais entraves do diagnóstico da DC é a possibilidade de reatividade cruzada, sobretudo com o gênero *Leishmania* spp. devido à proximidade filogenética com o *T. cruzi*. No entanto, com exceção da IBMP-8.2, a maior frequência de reatividade cruzada foi para as outras doenças analisadas, o que indica a necessidade de investigar em outras plataformas diagnósticas, e/ou outras condições se este comportamento se confirma em novos achados. Além disso, foi observado que os antígenos quiméricos superaram o revés da maior ocorrência de reatividade cruzada com a leishmaniose, aumentando desta maneira a segurança da sua aplicabilidade, inclusive para diagnóstico diferencial.

6.4 CONCORDÂNCIA COM TESTE COMERCIAL ADAPTADO PARA CÃES

Afim de se comparar os resultados obtidos utilizando as moléculas IBMP no diagnóstico sorológico para DC canina, utilizou-se no presente estudo o teste comercial Gold Elisa Chagas (REM Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) de forma adaptada à espécie. Esta adaptação foi realizada em estudo prévio conduzido por nosso grupo (LEONY *et al.*, 2019). Foi possível observar que ao confrontar os achados com os antígenos quiméricos e o kit comercial, levando em consideração os parâmetros de sensibilidade, especificidade, AUC, acurácia e DOR, o uso do teste comercial apesar de ter garantido bom desempenho diagnóstico, ainda ficou aquém da performance das moléculas IBMP-8.4, IBMP-8.3 e IBMP-8.2, sendo superior

apenas a molécula IBMP-8.1. De todo modo, o teste comercial demonstrou capacidade de identificar corretamente as amostras inseridas no estudo, obtendo níveis de sensibilidade de 62,3%, especificidade de 98,6%, AUC de 89,9%, além de alcançar valores de exatidão de 94,3% e DOR de 114,2. A razão do bom desempenho do mesmo no painel amostral aplicado, pode ser justificado pelo fato deste kit utilizar na matriz antígenos recombinantes e lisado do parasita proveniente de cepas brasileiras, motivo também pelo qual apresentou um padrão de IR nos diferentes estados analisados (SANTOS *et al.*, 107b).

Em relação as reações cruzadas, o Gold Elisa Chagas, classificou erroneamente 40 amostras, sendo elas majoritariamente oriundas de cães verdadeiramente positivos para anaplasmoses e dirofilariose. Devido a possibilidade de ocorrência de reatividade cruzada, bem como um menor índice de sensibilidade obtido, este teste comercial, assim como em humanos, não deve ser utilizado de forma isolada para o diagnóstico da doença de Chagas em cães, devendo-se desta forma adotar outros testes para confirmação da suspeita clínica, visando mitigar as possíveis falhas diagnósticas.

7 CONCLUSÕES

- Os antígenos IBMP apresentam elevado poder discriminatório entre amostras positivas e negativas da doença de Chagas canina;
- O antígeno IBMP-8.2 foi o que apresentou a maior sensibilidade, sendo o antígeno que identificou mais corretamente a infecção nos animais positivos para a DC;
- Os antígenos IBMP-8.2 IBMP-8.3 e IBMP-8.4 apresentaram elevados valores de *odds ratio* diagnóstico, sendo indicados para diagnóstico da DC em cães;
- A utilização combinada de dois antígenos IBMP para o diagnóstico da DC não deve ser realizada utilizando a estratégia em série;
- A utilização da análise em paralelo de dois antígenos IBMP para o diagnóstico da DC aumenta o desempenho diagnóstico e deve ser estimulada;
- A análise da reatividade cruzada para os quatro antígenos foi baixa;
- O desempenho dos antígenos IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 foi superior ao do Gold Chagas ELISA adaptado para cães.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar o uso isolado ou combinado dos antígenos em outras plataformas diagnósticas voltadas à detecção da infecção por *T. cruzi* na espécie canina;
- Ampliar o quantitativo amostral utilizado para avaliar reatividade cruzada e desempenho diagnóstico dos antígenos quiméricos;
- Avaliar o desempenho dos antígenos quiméricos no diagnóstico da infecção por *T. cruzi* em outras espécies de animais domésticos.

9 LIMITAÇÕES

- A pandemia em decorrência do vírus SARS -CoV- 2, dificultou o acesso aos laboratórios durante o período de isolamento social (*lockdown*);
- Reforma interna do Laboratório Avançado de Saúde Pública – LASP. Durante este período, a plataforma de microscopia eletrônica cedeu espaço para andamento da parte experimental, minorando o impacto no cronograma do estudo;
- Atraso no recebimento dos conjugados para o processamento das amostras do Piauí. Devido a limitações ocasionadas pela pandemia, as amostras do Piauí não foram incluídas no estudo.

REFERÊNCIAS

- AKOBENG, A. K. Understanding diagnostic tests 2: likelihood ratios, pre- and post- test probabilities and their use in clinical practice. **Acta Paediatrica**, Basel, v. 96, n. 4, p. 487-491, Fev. 2007.
- ALENCAR, M. M. F. *et al.* Epidemiologia da Doença de Chagas aguda no Brasil de 2007 a 2018. **Research, Society and Development**, Madrid, v. 9, n. 10, p. e8449109120-e8449109120, out. 2020.
- ALVES, D. F. *et al.* Métodos de diagnóstico para a doença de Chagas: uma atualização. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Fortaleza, v. 50, n. 4, p. 330-333, nov. 2018.
- AMELOTTI I.; CATALÁ, S. S.; GORLA, D. E. The residual efficacy of a cypermethrin pour-on formulation applied on goats on the mortality and blood intake of *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 8, p. 1011-1015, Dec. 2012.
- 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, June 1994.
- ANDRADE, Z. A. The canine model of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, supl. 0, p. 77-83, July 1984.
- ANDRADE, Z. A. *et al.* The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 57, n. 3, p. 328-336, Sept. 1997.
- APARICIO-BURGOS, J. E. *et al.* Testing the efficacy of a multi-component DNA-prime/DNA-boost vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco v. 5, n. 5, p. e1050, May 2011.
- ARCE-FONSECA, M. *et al.* DNA Vaccine treatment in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology Research**, United Kingdom, v. 2020, p. 9794575, May 2020.
- ARGOLO, A. M. *et al.* A doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. 1ed. 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-seusprincipais-vetores-no-Brasil.pdf>.
- AVILA, H. A. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 9, p. 2421-2426, Sept.1993.

- BARR, S. C. *et al.* Pathologic features of dogs inoculated with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 52, n. 12, p. 2033-2039, Dec. 1991.
- BARR, S. C.; GOSSETT, K. A.; KLEI, T. R. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observations of trypanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 52, n. 6, p. 954-960, June 1991.
- BARR, S. C. Canine Chagas' disease (American trypanosomiasis) in North America. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1055-1064, Nov. 2009.
- BELLUZO, M. S.; Ribone, M. E.; Camussone, C.; Marcipar, I. S.; Lagier C. M. Favorably orienting recombinant proteins to develop amperometric biosensors to diagnose Chagas' disease. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 408, n. 1, p. 86-94, Jan. 2011.
- BERN, Caryn *et al.* Chagas disease in the United States: a public health approach. **Clinical microbiology reviews**, San Francisco, v. 33, n. 1, Jan. 2019.
- 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**, v. 109, n. 7, p. 887-898, Nov. 2014.
- BLANDON, R. *et al.* Evaluacion clinica, electrocardiografica y angiografica de los reservorios naturales de la enfermedad de Chagas en la Republica de Panamá. **Revista Médica de Panamá**, Panama, v.20, n.3, p.108-115, sept. 1995.
- BOELAERT, M.; Aoun, K.; Liinev, J.; Goetghebeur, E.; Van der Stuyft. P. The potential of latent class analysis in diagnostic test validation for canine *Leishmania infantum* infection. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 123, n. 3, p. 499-506, Dec. 1999.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? **Current Molecular Medicine**, Illinois, v. 8, n. 6, p. 510-518, Sept. 2008.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Diário Oficial da União – Seção 1, número 127, de 06 de julho de 2020. Resolução-RE N° 2.281, de 2 de julho de 2020.
- BUSSELMAN, Rachel E. *et al.* High incidence of *Trypanosoma cruzi* infections in dogs directly detected through longitudinal tracking at 10 multi-dog kennels, Texas, USA. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 11, p. e0009935, Nov. 2021.
- BUSTAMANTE GOMEZ, Marinely; GONÇALVES DIOTAIUTI, Liléia; GORLA, David E. Distribution of pyrethroid resistant populations of *Triatoma infestans* in the Southern Cone of South America. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004561, Mar. 2016.

- BURGOS, J. M. *et al.* Molecular diagnosis and treatment monitoring of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* to twins of a triplet delivery. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 65, n. 1, p. 58-61, Sept. 2009.
- CALDERÓN, Johan M. *et al.* Deltamethrin resistance in Chagas disease vectors colonizing oil palm plantations: implications for vector control strategies in a public health-agriculture interface. **Parasites & vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-10, Apr. 2020.
- CAMACHO, A. A.; ALVES, R. O. Cardiopatía chagásica en caninos. **Afecciones Cardiovasculares en Pequeños Animales. 2^{da} Ed. Intermédica. Buenos Aires**, p. 289-295, 2007.
- CAMUSSONE, C. *et al.* Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 16, n. 6, p.899-905, 1 Apr. 2009.
- CARRADA-BRAVO, T. *Trypanosoma cruzi*: Natural history and diagnosis of the Chagas' disease. **Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, Irapuato, v. 51, n. 4, p. 205-219, Apr. 2004.
- CASULLI, A. New global targets for NTDs in the WHO roadmap 2021-2030. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco v. 15, n. 5, p. e0009373, May 2021.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 57, n. 4, p. 953-994, Dec. 1993.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, London, v. 6, n. 3, p. 342-345, June 2010.
- CHAGAS, C. J. R. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiolojico da nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, 159-218, ago. 1909.
- CHAVES, G. C. *et al.* Estimación de la demanda de medicamentos antichagásicos: una contribución para el acceso en América Latina. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 41, p. e45, June 2017.
- COLLINS, L. M.; LANZA, S. T. (2010). *Latent Class and Latent Transition Analysis: With Applications in the Social, Behavioral, and Health Sciences*. Ed. Wiley. ISBN: 978-0-470-22839-5 December 2009 330 Pages.
- COSTA, T. F. *et al.* Seroprevalence and detection of *Trypanosoma cruzi* in dogs living in a non-endemic area for Chagas disease in the legal Amazon region, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 26, p. 100648, Dec. 2021.
- CORDEIRO, T. A. R. *et al.* Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam v. 169, p. 112573, Aug. 2020.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, Jan. 2002.

COURA, J. R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 30-33, mar. 2003.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 3, p. 286-296, June 2012.

CRESCENTE, J. A. *et al.* Ocorrência de 4 casos agudos de doença de Chagas na vila de Icoaracá-PA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 25, n. supl 1, p. 29, 1992.

CRESCENTE, J. A. B. *et al.* Análise clínica e epidemiológica de 20 casos autóctones de doença de Chagas aguda ocorrido no período de janeiro de 1988 a dezembro de 1992, no Estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 27, supl I, p. 182, 1994.

CROFT, S. L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 215-220, Apr. 1999.

CUNHA, E. L. Alves *et al.* Benznidazole, itraconazole and their combination in the treatment of acute experimental Chagas disease in dogs. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 204, p. 107711, Sept. 2019.

DALTRO, R. T. *et al.* Cross-reactivity using chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens: diagnostic performance in settings where Chagas disease and American cutaneous or visceral leishmaniasis are coendemic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 57, n. 8, p. e00762-19, July 2019.

DANTAS, M. M. O. Ocorrência de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) e *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885), em cães de área rural, no município de Rio Branco-Acre. [s.l.] Universidade Federal do Acre, 2016.

DARIO, M. A. *et al.* Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 477, Aug. 2016

DAS NEVES PINTO, A. Y. *et al.* Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 6, Dec. 2008.

DE OLIVEIRA PORFIRIO, G. E. *et al.* Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *T. 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**, London, v. 7, n. 3, p. 398-404, Oct. 2018.

DE SOUSA, M. R.; RIBEIRO, A. L. P. Revisão sistemática e meta-análise de estudos de Diagnóstico e Prognóstico: um tutorial. **Arquivo Brasileiro Cardiolgia**, v. 92, n. 3, p. 241-251, fev. 2009.

- DE SOUZA, G. B. *et al.* Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in dogs located in Ituberá, Southern Bahia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 881-885, Nov. 2018.
- DEAN, A. G. *et al.* OpenEpi: open-source epidemiologic statistics for public health, version. 2013. Disponível em: https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm. Acesso em: 22 ago. 2020.
- DHIMAN, M. *et al.* Enhanced nitrosative stress during *Trypanosoma cruzi* infection causes nitrotyrosine modification of host proteins: implications in Chagas' disease. **The American journal of pathology**, v. 173, n. 3, p. 728-740, Sept. 2008.
- DIAS E. *et al.* Chagas' disease: a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, Dallas, v. 14, n. 6, p. 1035-1060, Dec. 1956.
- DIAS, J. C. P. *et al.* II Brazilian consensus on Chagas disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 49, n. suppl 1, p. 3-60, Dec. 2016.
- DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 1997.
- DIPTI, C. A.; JAIN, S. K.; NAVIN, K. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 47, n. 1, p. 319-328, 2006.
- DOCAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 12, p. 1157-1164, Aug. 2001.
- DOS SANTOS, F. *et al.* Eco-epidemiology of vectorial *Trypanosoma cruzi* transmission in a region of Northeast Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 225, p. 106184, Oct. 2021.
- 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.
- DUMONTEIL, E. *et al.* Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 72, n. 1, p. 46-53, Jan. 2004.
- 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, Mar. 2009.
- 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, July 2014.
- GADELHA, A. A. M. *et al.* Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the hemagglutination test. **Vox Sanguinis**, Basel, v. 85, n. 3, p. 165-170, Oct. 2003.
- GOMES, Y. M.; LORENA, V.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 115-121, July 2009.

Gonzalez, V. D. G.; Garcia, V. S.; Vega J. R.; Marcipar, I. S.; Meira, G.R.; Gugliotta, L. M. Immunodiagnosis of Chagas disease: synthesis of three latex–protein complexes containing different antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 12-17, May. 2010.

GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R. D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 45, n. 1/2, p. 23-41, May. 2000.

GÜRTLER, L. *et al.* Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 27-38, Nov. 1998.

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. *et al.* Effects of topical application of fipronil spot-on on dogs against the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 103, n. 3, p. 298-304, Mar. 2009.

GÜRTLER, R. E. *et al.* Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 41, p. 16194-16199, Oct. 2007.

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**, Amsterdam, v. 151, p. 32-50, Nov. 2015.

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

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

JARAMILLO, N. *et al.* The role of *Rhodnius pallescens* as a vector of Chagas disease in Colombia and Panama. **Research and Reviews in Parasitology**, Madrid, v. 60, n. 3/4, p. 75-82, Jan. 2000.

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, Stephen A. *et al.* Kissing bugs in the United States: risk for vector-borne disease in humans. **Environmental Health Insights**, Auckland, v. 8, p. EHI. S16003, Dec. 2014.

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

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

- LAIÑO, M. A. *et al.* An oral dose of Fluralaner administered to dogs kills pyrethroid-resistant and susceptible Chagas disease vectors for at least four months. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 268, p. 98-104, Apr. 2019.
- LANA, M. *et al.* Experimental Chagas' disease in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 1, p. 59-71, Mar. 1992.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 159-174, Mar. 1977.
- LARDEUX, Frédéric *et al.* Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. **Tropical Medicine & International Health**, v. 15, n. 9, p. 1037-1048, Ago. 2010.
- LEÇA JÚNIOR, N. F. *et al.* Primeiro relato de infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães do sul da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 182-185, jan/mar. 2013.
- LEONY, L. M. *et al.* Performance of recombinant chimeric proteins in the serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 6, p. e0007545, June 2019.
- LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. **Frontiers in Public Health**, Lausanne, v. 7, p. 166, July 2019.
- LOZA, A. *et al.* Systemic insecticide treatment of the canine reservoir of *Trypanosoma cruzi* induces high levels of lethality in *Triatoma infestans*, a principal vector of Chagas disease. **Parasites & vectors**, London, v. 10, n. 1, p. 1-12, July 2017.
- MADIGAN, R. *et al.* Investigation of a combination of amiodarone and itraconazole for treatment of American trypanosomiasis (Chagas disease) in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 255, n. 3, p. 317-329, Aug. 2019.
- MAGGI, R. G.; KRÄMER, F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. **Parasites & Vectors**, London, v. 12, n. 1, p. 145, Mar. 2019.
- 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.
- MATTHEWS, Derek J. *et al.* Cardiac diagnostic test results and outcomes in 44 dogs naturally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Feb. 2021.
- MEDRONHO, R. A.; PEREZ, M. A. Testes Diagnósticos. In: MEDRONHO, R. A.; BLOCH, K. V.; LUIZ, R. R.; WERNECK, G. L. (Org). *Epidemiologia*. 2ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. p. 389-402.
- MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 401-404, Aug. 1999.

MONTENEGRO, V. M. *et al.* Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 4, p. 491-494, June 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**, London, v. 54, n. 5, p. 1861-1875, Sept. 2004.

MORENO, Elio A. *et al.* Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in Wistar rats during the acute phase of infection. **Investigación Clínica**, Mérida, v. 44, n. 3, p. 241-254, ago. 2003.

NOGUEIRA-PAIVA, N. C. *et al.* Myenteric plexus is differentially affected by infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains in Beagle dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 1, p. 51-60, Nov. 2014.

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: 2010. 184 p. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44440/9789241564090_eng.pdf;jsessionid=F0C0C607B3BB8731CA092F358A47E753D?sequence=1. Acesso em: 25 jun. 2020.

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.

PEREZ, T. D. *et al.* Prevalence of American trypanosomiasis and leishmaniases in domestic dogs in a rural area of the municipality of São João do Piauí, Piauí state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 58, p. 79, Nov. 2016.

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

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

PICOLLO, María Inés *et al.* High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 4, p. 637-642, Jul. 2005.

PINTO, A. Y. N. *et al.* Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Revista panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 25, n. 1, p. 77-83, 2009.

PONTES, V. M. O. *et al.* Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 2, p. 182-187, abr. 2010.

QUEIROGA, Tamyres Bernadete Dantas *et al.* Insecticidal efficacy of fluralaner (Bravecto®) against *Triatoma brasiliensis*, a major vector of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-9, Sep. 2021.

- QUIJANO-HERNÁNDEZ, I. A. *et al.* Preventive and therapeutic DNA vaccination partially protect dogs against an infectious challenge with *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, London, v. 31, n. 18, p. 2246-2252, Apr. 2013.
- QUIJANO-HERNANDEZ, I. A. *et al.* Therapeutic DNA vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, n. 1, p. 343-346, Dec. 2008.
- RASSI Jr., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, London, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr. 2010.
- REITHINGER, R. *et al.* Chagas disease control: deltamethrin-treated collars reduce *Triatoma infestans* feeding success on dogs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 99, n. 7, p. 502-508, July 2005.
- REITHINGER, R. *et al.* Extinction of experimental *Triatoma infestans* populations following continuous exposure to dogs wearing deltamethrin-treated collars. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 74, n. 5, p. 766-771, May 2006.
- REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. In: **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 2001. p. 856-856.
- RIBEIRO, R. D. *et al.* Histopathological study of the mammary gland in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Parasitology Research**, New York, v. 74, n. 3, p. 290-292, May 1988.
- ROCHITTE, C. E. *et al.* Cardiac magnetic resonance in Chagas' disease. **Artificial Organs**, Cleveland, v. 31, n. 4, p. 259-267, Apr. 2007.
- RODRÍGUEZ-MORALES, O. *et al.* Plasmid DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* genes induces cardiac and clinical protection against Chagas disease in the canine model. **Veterinary Research**, Warsaw, v. 43, n. 1, p. 1-10, Nov. 2012.
- RODRÍGUEZ-MORALES, O. *et al.* Sperm morphological features associated with chronic Chagas disease in the semen of experimentally infected dogs. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 91, n. 4, p. 810-815, Nov. 2014.
- RODRÍGUEZ-MORALES, OI. *et al.* *Trypanosoma cruzi* connatal transmission in dogs with Chagas disease: experimental case report. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 11, n. 10, p. 1365-1370, Oct. 2011.
- ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 62, n. 4-5, p. 576-588, Nov. 2010.
- 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
- SÁNCHEZ-VILLAMIL, J. P. *et al.* Potential role of antioxidants as adjunctive therapy in Chagas disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, v. 2020, p. 9081813, Mar. 2020.

SANTOS, F. L. N. *et al.* Performance assessment of four chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens based on antigen-antibody detection for diagnosis of chronic Chagas disease. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. e0161100, Aug. 2016a.

SANTOS, F. L. N. *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 2016b.

SANTOS, F. L. N. *et al.* Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic Chagas disease – a Phase II study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 3, p. e0005433, Mar. 2017a.

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

SANTOS, F. M. *et al.* Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Firenze, v. 67, n. 8, p. 1987-1995, Aug. 2012.

SANTOS, F. M. *et al.* Chagas cardiomyopathy: The potential effect of benznidazole treatment on diastolic dysfunction and cardiac damage in dogs chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Acta tropica**, Amsterdam, v. 161, p. 44-54, Sept. 2016.

SASAKI, A. T. *et al.* Sorodiagnóstico da doença de Chagas: novo reagente para o teste de hemaglutinação indireta (THAI IAL). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 137-144, abr. 1996.

SCHMUNIS, G. A. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, Suppl. 1, p. 93-101, Sept. 1999.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 117-143, Jan. 1995.

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.

SILVEIRA, A. C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 30, n. supl I, p. 42, 1997.

SIMÕES, M. V. *et al.* Chagas disease cardiomyopathy. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, São Paulo v. 31, n. 2, p. 173-189, nov. 2018.

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. 183, Feb. 2016.

SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 8, n. 4, p. 269-285, Mar. 2002.

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.

SWETS, J. A. Measuring the accuracy of diagnostic systems. **Science**, New York, v. 240, n. 4857, p. 1285-1293, June 1988.

TAFURI, W. L. *et al.* O cão como modelo experimental para o estudo da história natural da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 77-77, jun. 1988.

TANOWITZ, Herbert B. *et al.* Chagas' disease. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 5, n. 4, p. 400-419, Oct. 1992.

TORRICO, F. *et al.* Are maternal re- infections with *Trypanosoma cruzi* associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas disease? **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 628-635, May 2006.

TORRICO, F. *et al.* New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. S1473-3099, n. 20, p. 30844-6, Aug. 2021.

TRAVI, B. L. Considering dogs as complementary targets of Chagas disease control. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 19, n. 2, p. 90-94, Feb. 2019.

VALENTE, S. A. S. *et al.* Registro de doença de Chagas agudo em Sena Madureira, Estado do Acre. 1994. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 27, supl. I, p. 169, 1994.

VASSENA, C. V.; PICOLLO, M. I.; ZERBA, E. N. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. **Medical and veterinary entomology**, v. 14, n. 1, p. 51-55, Dec. 2000.

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 & International Health**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 1103-1109, Sept. 2013.

VIOTTI, R. J. *et al.* Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure. **Heart**, London, v. 90, n. 6, p. 655-660, June 2004.

VITOR, R. W. A. *Protozoa*. In: NEVES, D. P.; DE MELO, A.; LINARDI, P.; VITOR, R. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2012. p. 33-35.

VITT, J. P. *et al.* Diagnostic features of acute Chagas myocarditis with sudden death in a family of boxer dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Texas, v. 30, n. 4, p. 1210, Apr. 2016.

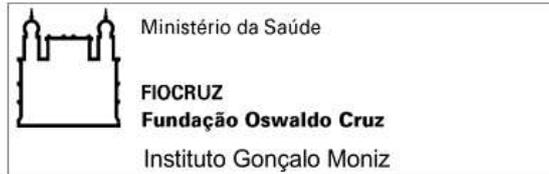
WILLIAMS, G. D. *et al.* Naturally occurring trypanosomiasis (Chagas' disease) in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 171, n. 2, p. 171-177, July 1977.

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.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 101-107, July 2009.

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

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais – FIOCRUZ

CI. nº 001/2021

Para: Fred Luciano Neves Santos

Pesquisador responsável pelo protocolo 002/2017

Assunto: Prorrogação de Vigência - Plano contingência pandemia

Prezado Pesquisador,

Em consonância com o plano de contingência da FIOCRUZ / IGM para a pandemia do SARS-Cov-2, nos termos definidos pela CEUA, a vigência do Protocolo 002/2017 de sua responsabilidade, intitulado: “Avaliação e validação do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do Trypanosoma cruzi”, foi prorrogada para 28/04/2022.

O prazo para o relatório final também foi alterado de acordo segue:

Vigência: 20/04/2021 a 28/04/2022.

Relatório final: 28/04/2022.

Atenciosamente

Salvador, 11 de fevereiro de 2021

Natália Machado Tavares
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ