

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANTÍGENOS RECOMBINANTES QUIMÉRICOS DO *Trypanosoma cruzi*
CONJUGADOS À PEROXIDASE E SUA AVALIAÇÃO COMO FERRAMENTA
DIAGNÓSTICA DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

NATÁLIA ERDENS MARON DE FREITAS

Salvador - Bahia

2021

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

**ANTÍGENOS RECOMBINANTES QUIMÉRICOS DO *Trypanosoma cruzi*
CONJUGADOS À PEROXIDASE E SUA AVALIAÇÃO COMO FERRAMENTA
DIAGNÓSTICA DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA**

NATÁLIA ERDENS MARON DE FREITAS

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

Orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos

Salvador - Bahia

2021

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

F866a Freitas, Natália Erdens Maron de.
Antígenos recombinantes quiméricos do *Trypanosoma cruzi* conjugados à peroxidase e sua avaliação como ferramenta diagnóstica da doença de Chagas crônica. / Natália Erdens Maron de Freitas. - 2021.
103f. : il. ; 30 cm.

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

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

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Imunoensaio. 4. Imunodiagnóstico. 5. ELISA. I. Título.

CDU 616.937

“ANTÍGENOS RECOMBINANTES QUIMÉRICOS DO TRYPANOSOMA CRUZI CONJUGADOS À PEROXIDASE E SUA AVALIAÇÃO COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA”.

NATÁLIA ERDENS MARON DE FREITAS

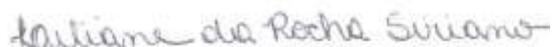
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 10 de agosto de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Márcia Cristina Aquino Teixeira
Professora Associada
UFBA



Dra. Liliane da Rocha Siriano
Servidora
HOSPITAL DAS CLINICAS/UFMG



Dra. Lúcia Maria da Cunha Galvão
Professora
UFRN

FONTES DE FINANCIAMENTO

Programa Inova Fiocruz

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

Código de Financiamento 001

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz (IGM)

AGRADECIMENTOS

O mestrado foi um grande desafio que aceitei e enfrentei de cabeça erguida. Foi um processo fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional em que aprendi a lidar com adversidades. Chegar até aqui foi um caminho árduo, mas hoje agradeço por cada etapa, pois foi assim que adquiri uma das características que mais admiro: a resiliência.

Aos meus pais, Cassia e Paulo, que são os meus pilares, jamais mediram esforços para me ensinar o bem e me apoiaram em todas as minhas decisões nessa trajetória. A eles, dedico este trabalho e todos os outros que virão pela frente.

Ao meu orientador, Dr. Fred Santos, por ter me recebido de braços abertos em seu grupo em 2017. Desde então, Dr. Fred confiou em mim para a realização deste e de outros projetos e se dedica imensamente ao crescimento de seus alunos. Ao meu grupo, agradeço por todas as discussões científicas e riquíssimas em conhecimento que tivemos ao longo dos anos. Tenho muito orgulho de dizer que acompanhei o crescimento e amadurecimento do Grupo SerdYtech. Em especial aos meus colegas de laboratório que se tornaram amigos, MSc. Ângelo Silva, MSc. Emily Ferreira, MSc. Leonardo Leony e Ramona Daltro. Vocês fizeram toda a diferença nessa jornada. Apesar do menor tempo de convivência, não poderia deixar de agradecer à Gabriela Duarte, Larissa Carvalho, Natália Dantas e Fernanda Habib pelo auxílio em laboratório e momentos de descontração na copa do LASP.

À toda equipe do LASP, que estará para sempre em meu coração e memória. Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, à biblioteca do IGM e às instituições parceiras por ajudarem a tornar este projeto realidade.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável,
elas são uma abertura para achar as que estão certas.

Carl Sagan

FREITAS, Natália Erdens Maron de. Antígenos recombinantes quiméricos do *Trypanosoma cruzi* conjugados à peroxidase e sua avaliação como ferramenta diagnóstica da doença de Chagas crônica. 103 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O ELISA geralmente é o teste de escolha para o diagnóstico da doença de Chagas (DC), no entanto, o seu desempenho depende da preparação antigênica utilizada na fase sólida, podendo levar a resultados falso-positivos e reações cruzadas. A utilização de antígenos recombinantes quiméricos pode superar esta limitação. Quatro antígenos quiméricos do *Trypanosoma cruzi* (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4) foram desenvolvidos e avaliados em estudos de fase I e II. Contudo, a utilização de anticorpo secundário anti-IgG humano marcado com peroxidase, como ocorre na metodologia indireta, limita o uso da técnica para a detecção de anticorpos espécie-específicos e classe-específicos. Para proporcionar a identificação de anticorpos anti-*T. cruzi* em diferentes espécies através do mesmo ensaio é possível utilizar o próprio antígeno quimérico marcado com peroxidase, utilizando o ELISA sanduíche duplo antígeno (DAS-ELISA). **OBJETIVO:** Avaliar e validar o desempenho diagnóstico dos antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 como matrizes antigênicas e agentes de detecção após conjugação à peroxidase, para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* em humanos. **MÉTODOS:** O DAS-ELISA foi otimizado por *checkerboard titration*. Para o estudo da fase I (prova de conceito), foram avaliadas 207 amostras positivas e 205 negativas. A reatividade cruzada para outras infecções também foi avaliada utilizando 68 amostras. **RESULTADOS:** As condições selecionadas para realização dos ensaios foram 25 ng de antígeno, conjugado diluído de 1:2.000 para todas as moléculas e ausência de diluição sérica. No presente estudo, as áreas abaixo da curva dos antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 foram de 98,7%, 99,5%, 98,6% e 98,8%, respectivamente. Dentre as amostras positivas, o antígeno IBMP-8.1 classificou 53 (25,6%) como falso negativas, o IBMP-8.2, 27 (13%), o IBMP-8.3, 24 (11,6%) e o IBMP-8.4, 43 (20,8%), conferindo valores de sensibilidade de 74,4%, 87%, 88,4% e 79,2%, respectivamente. O único antígeno que não atingiu uma especificidade de 100% foi o IBMP-8.3, com 96,6%. Esta foi também a única molécula a apresentar reatividade cruzada com uma amostra de HTLV. **CONCLUSÃO:** O DAS-ELISA é uma ferramenta promissora para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* e, apesar dos altos valores de AUC encontrados, o desempenho deste ensaio foi diferente dos valores obtidos pelo nosso grupo ao empregar esses antígenos no ELISA indireto, por este motivo, melhorias serão consideradas para aumentar a sensibilidade do DAS-ELISA no estudo de fase 2.

Palavras-chave: doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Imunoensaio, Imunodiagnóstico, ELISA.

FREITAS, Natália Erdens Maron de. Evaluation of horseradish peroxidase-conjugated *Trypanosoma cruzi* recombinant chimeric antigens for chronic Chagas Disease diagnosis. 103 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2021.

ABSTRACT

BACKGROUND: Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are generally the chosen test for Chagas disease (CD) diagnosis; however, its performance depends on the antigen preparation adsorbed to the solid phase, which may lead to false-positive results and cross reactions. The use of chimeric recombinant antigens can overcome this limitation. Four chimeric antigens from *T. cruzi* (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 and IBMP-8.4) were developed and evaluated in phase I and II studies. However, peroxidase-labeled secondary anti-human IgG antibody, which is employed in indirect ELISAs, limits its use for the detection of species-specific and class-specific antibodies. To overcome this limitation, peroxidase-labeled antigens can be utilized, diagnosing both acute or chronic infection, in a species and immunoglobulin class-independent manner, through the use of a double-antigen sandwich ELISA (DAS-ELISA). **OBJECTIVE:** Evaluate and validate the diagnostic performance of the chimeric antigens IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 and IBMP-8.4 in the DAS-ELISA platform. **METHODS:** DAS-ELISA was optimized by checkerboard titration. In phase I study, 207 positive and 205 negative samples were evaluated. Cross-reactivity to other infections was also assessed using 68 samples. **RESULTS:** The selected conditions for the tests utilized 25ng of antigen per well and the conjugate diluted at 1:2,000 for all molecules. In the phase I study, the areas under the curve of IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 and IBMP-8.4 were 98.7%, 99.5%, 98.6% and 98.8%, respectively. Among the positive samples, IBMP-8.1 antigen classified 53 (25.6%) as false negative, IBMP-8.2, 27 (13%), IBMP-8.3, 24 (11.6%) and IBMP-8.4, 43 (20.8%), giving sensitivities of 74.4%, 87%, 88.4% and 79.2%, respectively. The only antigen that did not reach 100% specificity was IBMP-8.3, with 96.6%. IBMP-8.3 was also the only molecule to show cross-reactivity with HTLV. **CONCLUSION:** DAS-ELISA is a promising tool for immunodiagnosis, and despite the high AUC values, the performance of this assay was different from the values obtained by our group when using these antigens in the indirect ELISA, for this reason, improvements are being considered to increase the sensitivity of the DAS-ELISA.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Immunoassay, Immunodiagnosis, ELISA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (A) e Oswaldo Gonçalves Cruz (B)...	20
Figura 2	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 3	Triatomíneos da espécie <i>Triatoma infestans</i> geralmente encontrados em regiões endêmicas da América do Sul e habitas normalmente usados por esta espécie.....	23
Figura 4	Formação do chagoma de inoculação (A) e do sinal de Romana (B).....	25
Figura 5	Raio-X torácico de indivíduos acometidos pela forma cardíaca da doença de Chagas.....	27
Figura 6	Manifestações gastrointestinais da DC crônica. (A) Megaesôfago (grupos I, II, III e IV). (B) Hipertrofia de parótidas em paciente com megaesôfago. (C) Megaestômago associado ao megaesôfago grupo IV. (D) Colecistomegalia. (E) Megaduodeno. (F) Megajejuno. (G) Megaíleo. (H) Megareto. (I) Megasigmóide. (J) Megaretosigmóide. (K) Megacólon total. (L) Fecaloma. C, D, E, F e G são manifestações raras.....	28
Figura 7	Rotas de migração de indivíduos infectados provenientes de países endêmicos para países indenes.....	30
Figura 8	Relação entre os ciclos silvestre, doméstico e peridoméstico da transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 9	Reação de imunofluorescência indireta utilizando formas epimastigotas (A) como antígenos na diluição do soro positivo de 1:80 e controle negativo (B).....	33
Figura 10	Representação esquemática do teste de hemaglutinação indireta.....	34
Figura 11	Representação esquemática do teste de ELISA indireto.....	35
Quadro 1	Ensaio de ELISA sanduíche duplo-antígeno disponíveis na literatura classificados por ano de publicação.....	39
Figura 12	Representação esquemática do ELISA sanduíche duplo-antígeno.....	40
Quadro 2	Classificação do valor da área abaixo da curva ROC.....	48
Quadro 3	Classificação do índice de Kappa (κ).....	49
Figura 13	Possíveis combinações entre resultados obtidos em um teste diagnóstico e o verdadeiro status da doença.....	50

Figura 14	SDS-PAGE dos antígenos IBMP.....	51
Figura 15	Fluxograma representando o desenho do estudo para diagnóstico da doença de Chagas em amostras humanas através do DAS-ELISA.....	52
Figura 16	Análise gráfica dos valores médios de densidade óptica do antígeno IBMP-8.4 na padronização preliminar.....	54
Figura 17	Análise gráfica dos valores médios de densidade óptica do antígeno IBMP-8.4.....	55
Figura 18	Análise gráfica dos valores médios de densidade óptica do antígeno IBMP-8.1 (A), IBMP-8.2 (B) e IBMP-8.3 (C).....	58
Figura 19	Representação gráfica dos índices de reatividade dos antígenos IBMP no estudo de fase I (A), suas respectivas curvas ROC (B) e parâmetros de desempenho diagnóstico (C).....	63
Figura 20	Representação gráfica dos intervalos de confiança a 95% (IC95%) da AUC, sensibilidade, especificidade, acurácia e índice de Kappa de Cohen, determinados para os antígenos IBMP.....	64
Figura 21	Análise gráfica da reatividade cruzada dos antígenos IBMP com soro de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise da densidade óptica média dos <i>pools</i> utilizados na padronização do antígeno IBMP-8.4.....	56
Tabela 2	Análise da densidade óptica média dos <i>pools</i> utilizados na padronização do antígeno IBMP-8.1.....	59
Tabela 3	Análise da densidade óptica média dos <i>pools</i> utilizados na padronização do antígeno IBMP-8.2.....	60
Tabela 4	Análise da densidade óptica média dos <i>pools</i> utilizados na padronização do antígeno IBMP-8.3.....	61
Tabela 5	Análise do desempenho diagnóstico das proteínas quiméricas IBMP considerando as análises em série e em paralelo.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acurácia
AUC	Área abaixo da curva (<i>Area Under Curve</i>)
BA	Bahia
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CLIA	Testes quimiluminescentes
CO	Ponto de corte (<i>Cut-off</i>)
CRA	Antígeno repetitivo citoplasmático (<i>Cytoplasmatic Repetitive Antigen</i>)
DAS-ELISA	ELISA sanduíche duplo-antígeno (<i>Double-antigen sandwich ELISA</i>)
DAS-TRIFMA	Ensaio imunofluorimétrico de duplo-antígeno
DC	Doença de Chagas
DO	Densidade óptica
DP	Desvio-padrão
DTU	Unidade de tipagem discreta (<i>Discrete Typing Unit</i>)
EIA/ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ESP	Especificidade
FN	Falso negativo
FP	Falso-positivo
FRA	Antígeno repetitivo flagelar (<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>)
HAI	Hemaglutinação indireta
HBC	Antígeno do core do vírus da Hepatite B (<i>Hepatitis B virus</i>)
HBV	Vírus da Hepatite B (<i>Hepatitis B virus</i>)
HCV	Vírus da Hepatite C (<i>Hepatitis C virus</i>)
HEMOBA	Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HRP	Peroxidase de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano (<i>Human T-Lymphotropic Virus</i>)
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
IBMP-DAS-ELISA	IBMP-ELISA sanduíche duplo-antígeno
IC95%	Intervalo de Confiança de 95%
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
IR	Índice de Reatividade
kDNA	DNA do cinetoplasto (<i>Kinetoplast DNA</i>)
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LASP	Laboratório Avançado de Saúde Pública
LCA	Análise de classe latente (<i>Latent Class Analysis</i>)
LEI	Leishmaniose visceral
LFA	Imunoensaio de fluxo lateral (<i>Lateral Flow Assay</i>)
NEG	Amostras negativas
PBS	Tampão Fosfato-salina (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBS-Tween	Tampão fosfato-Tween 20 (<i>Phosphate buffered saline-Tween</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFN	Proporção de falso-negativos
PFP	Proporção de falso-positivos
pH	Potencial Hidrogeniônico
POS	Amostras positivas
PR	Paraná
RJ	Rio de Janeiro
ROC	Característica de Operação do Receptor (<i>Receiver Operating Characteristic</i>)
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SENS	Sensibilidade
SIF	Sífilis
TMB	Tetra-metil-benzidina
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
VN	Verdadeiro negativo
VP	Verdadeiro-positivo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
SUS	Sistema Único de Saúde
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual que
≥	Maior ou igual que
°C	Graus Celsius
J	Índice de Youden
kDa	Quilodaltons
M	Molar
mA	Miliampere
min	Minutos
mM	Milimolar
MM	Massa molecular
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
\bar{X}	Média aritmética
κ	Índice Kappa de Cohen
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	19
2.2	O <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
2.3	TRANSMISSÃO	22
2.4	CLÍNICA	25
2.4.1	Fase aguda	25
2.4.2	Fase crônica	25
2.4.2.1	<i>Forma cardíaca</i>	26
2.4.2.2	<i>Forma digestiva</i>	27
2.5	TRATAMENTO.....	28
2.6	EPIDEMIOLOGIA.....	29
2.7	DIAGNÓSTICO	31
2.7.1	Metodologias sorológicas	32
2.8	ANTÍGENOS IBMP.....	36
2.9	ELISA SANDUÍCHE DUPLO-ANTÍGENO (DAS-ELISA)	38
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	42
4.2	LOCAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E PROCEDIMENTOS.....	42
4.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	42

4.4	OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES QUIMÉRICOS.....	42
4.5	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE).....	43
4.6	CONJUGAÇÃO DOS ANTÍGENOS À PEROXIDASE.....	43
4.7	PAINÉIS SOROLÓGICOS	43
4.7.1	Dimensionamento amostral	43
4.7.2	Obtenção e caracterização do painel sorológico	43
4.7.3	Crítérios de inclusão amostral	44
4.7.4	Crítérios de exclusão amostral	44
4.8	PADRONIZAÇÃO DO IBMP-ELISA SANDUÍCHE DUPLO-ANTÍGENO (IBMP-DAS-ELISA)	45
4.9	EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO.....	46
4.10	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO	47
4.10.1	Estudo de fase I.....	47
4.10.2	Análise em série e em paralelo.....	47
4.10.3	Estudo da reatividade cruzada.....	47
4.11	INTERPRETAÇÃO DOS DADOS.....	48
4.11.1	Normalização dos dados, definição do ponto de corte e da área abaixo da curva	48
4.11.2	Cálculo do índice <i>Kappa</i> de Cohen.....	49
4.11.3	Avaliação do parâmetros de desempenho	49
4.11.4	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS	51
5.1	SDS-PAGE PARA ANÁLISE DA INTEGRIDADE DOS ANTÍGENOS IBMP	51
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO	51
5.3	PADRONIZAÇÃO DO IBMP-DAS-ELISA	53
5.4	ESTUDO DE FASE I.....	61
5.4	ESTUDO DA REATIVIDADE CRUZADA	65

6	DISCUSSÃO	68
6.1	PADRONIZAÇÃO DO IBMP-DAS-ELISA	69
6.2	ESTUDO DE FASE I	71
6.3	ESTUDO DA REATIVIDADE CRUZADA	72
7	CONCLUSÕES	74
8	PERSPECTIVAS	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICE	90

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, tem como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que 6-7 milhões de indivíduos estejam infectados no mundo, localizando-se principalmente em 21 países da América Latina (WHO, 2019). Nestes países, os vetores dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* são os de maior importância epidemiológica (WHO, 2002). No entanto, a DC também se estende para os estados do Sul dos Estados Unidos, onde já foi reportada a presença de vetores dos gêneros *Triatoma* e *Paratriatoma* (BERN *et al.*, 2011).

A via clássica de transmissão do *T. cruzi* em regiões endêmicas é a vetorial, que ocorre através da liberação de formas tripomastigotas metacíclicas do parasito nas fezes e urina de triatomíneos popularmente conhecidos como barbeiros, durante o repasto sanguíneo. No entanto, outras vias de infecção são descritas, como a transfusional (transfusão de hemoderivados), congênita, oral (consumo de alimentos e bebidas contaminados), transplante de órgãos contaminados e, menos frequentemente, acidentes laboratoriais (CDC, 2019).

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi* é dependente da fase da doença. Quando esta se encontra na fase aguda, as metodologias utilizadas são aquelas que se baseiam em técnicas de cultivo do parasito ou na sua visualização por métodos parasitológicos diretos ou indiretos (AFONSO; EBELL; TARLETON, 2012), pois esta fase geralmente é marcada pela abundância de parasitos circulantes. Já a fase crônica é caracterizada por parasitemia subpatente e aumento dos níveis de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, sendo assim, o diagnóstico é baseado em testes sorológicos indiretos como a imunofluorescência indireta (IFI), a hemaglutinação indireta (HAI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), testes quimiluminescentes (CLIA) e testes imunocromatográficos rápidos. Destes, os testes de ELISA são os mais frequentemente utilizados dada a possibilidade de automação, realização do diagnóstico de muitos indivíduos concomitantemente e baixo custo (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). Contudo, a depender dos antígenos utilizados para a sensibilização da fase sólida, resultados indesejados (falso-positivos e falso-negativos) podem ocorrer. De fato, os testes que utilizam preparações antigênicas produzidas a partir do lisado do parasito tendem a produzir maior quantitativo de resultados falso-positivos, muitos deles oriundos da reatividade cruzada com espécies do gênero *Leishmania* spp. (DALTRO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2016a). Por outro lado, a utilização de antígenos recombinantes nos testes de ELISA resultou no aumento da especificidade decorrente e redução da reatividade cruzada com espécies do gênero *Leishmania* spp. Todavia, apesar do avanço alcançado, foi observada redução na sensibilidade dos testes. Este fato deveu-se ao

elevado grau de variabilidade genética do *T. cruzi*. Desta forma, nem todos os antígenos recombinantes são reconhecidos pela integralidade de cepas circulantes em diferentes regiões geográficas (MARTIN *et al.*, 2014; VERANI *et al.*, 2009) ou em áreas com diferentes prevalências da infecção (LEEFLANG; BOSSUYT; IRWING, 2009; LEEFLANG *et al.*, 2013).

Por este motivo, a busca por novos antígenos é de fundamental importância para o diagnóstico sorológico da DC (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2008). Uma alternativa para a resolução deste problema baseia-se na utilização de proteínas recombinantes quiméricas do *T. cruzi*. Estas proteínas podem ser sintetizadas utilizando epítomos repetitivos e conservados de diferentes proteínas do parasito unidas em uma única molécula, elevando, desta maneira, a sensibilidade do teste sem, contudo, reduzir a especificidade, uma vez que as sequências responsáveis por gerar reatividade cruzada podem ser excluídas da composição da molécula (CAMUSSONE *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ *et al.*, 2010; HOUGHTON *et al.*, 1999). Nos últimos anos, por meio de técnicas de engenharia genética, quatro proteínas recombinantes quiméricas denominadas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 foram expressas, purificadas e seu potencial diagnóstico avaliado. Inicialmente, os antígenos foram submetidos aos estudos de fase I (SANTOS *et al.*, 2016b) e II, através do ELISA (SANTOS *et al.*, 2017a), microarranjo líquido (SANTOS *et al.*, 2017b) e imunocromatografia (SILVA, 2016; SILVA *et al.*, 2020), demonstrando altos valores de acurácia e baixos índices de reatividade cruzada (DALTRO *et al.*, 2019). Adicionalmente, foi realizada uma análise de classe latente (LCA), ferramenta estatística que já foi utilizada para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* e que possui finalidade de avaliar métodos diagnósticos na ausência de um padrão-ouro (CASTRO-SESQUEN *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2018). Em 2019, dois estudos foram conduzidos avaliando o desempenho dos antígenos IBMP em detectar anticorpos anti-*T. cruzi* em amostras de indivíduos infectados residentes em diversas localidades da Argentina, Bolívia e Paraguai (DEL-REI *et al.*, 2019), bem como em imigrantes latino-americanos residentes em Barcelona/Espanha (DOPICO *et al.*, 2019). Similarmente, o potencial diagnóstico dos antígenos IBMP também foi avaliado para a DC canina (CORDEIRO *et al.*, 2020; LEONY *et al.*, 2019), tendo em vista que os cães apresentam relevância epidemiológica pois são considerados como grupo sentinela no ambiente peridomiciliar, evidenciando a ocorrência do ciclo de transmissão, com correlação direta com a positividade em humanos (GÜRTLER *et al.*, 2007, 2014).

Apesar de apresentar resultados promissores, o teste de ELISA indireto utiliza anticorpos secundários IgG anti-humano marcados com peroxidase, limitando a técnica para análise específica apenas do soro humano. Todavia, pensando na ampliação do espectro de utilização dos antígenos IBMP utilizando a metodologia do ELISA, propomos a avaliar e validar o potencial

diagnóstico da técnica de ELISA sanduíche duplo-antígeno (DAS), que utiliza o próprio antígeno marcado com a peroxidase como agente de detecção dos anticorpos anti-*T. cruzi*. Desta forma, um único teste diagnóstico poderá ser empregado para identificar a infecção pelo parasito independente da origem do soro, seja para seres humanos ou para reservatórios domésticos e silvestres, sendo que para estes últimos não há testes comerciais disponíveis.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Entre os anos de 1907 e 1909, o médico e cientista brasileiro Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (Figura 1A) descreveu a doença de Chagas pela primeira vez na cidade de Lassance, Minas Gerais, onde recebeu a tarefa de auxiliar no combate à epidemia de malária que assolava trabalhadores da construção da Estrada de Ferro Central do Brasil. Naquela ocasião, Chagas foi alertado por moradores locais sobre a presença de insetos hematófagos que habitavam residências humanas, os quais se alimentavam à noite e se escondiam nas frestas das casas durante o dia. Estes insetos eram conhecidos popularmente como barbeiros por picarem os rostos dos indivíduos durante seu sono. O referido inseto era da família Reduviidae e, ao analisar o seu conteúdo intestinal, Chagas observou a presença de organismos flagelados com morfologia epimastigota (CHAGAS, 1909). Após esta descoberta, alguns insetos foram enviados para o Dr. Oswaldo Cruz (Figura 1B), no Rio de Janeiro. Em seu laboratório, Oswaldo Cruz fez com que os insetos se alimentassem do sangue de saguis da espécie *Callithrix penicillata*. Cerca de 30 dias após o início dos experimentos foi observada a presença de tripanossomatídeos no sangue dos animais, com morfologia diferente de outras espécies já conhecidas do gênero *Trypanosoma* (KROPF; SÁ, 2009), porém similar àquela descrita por Chagas em Minas Gerais. Esta nova espécie foi batizada de *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu mentor, Oswaldo Cruz. Mais tarde, por acreditar que este parasito se multiplicava por esquizogonia e não por divisão binária como as demais espécies do gênero *Trypanosoma*, ele passou a se chamar *Schizotrypanum cruzi* (KROPF, 2006).

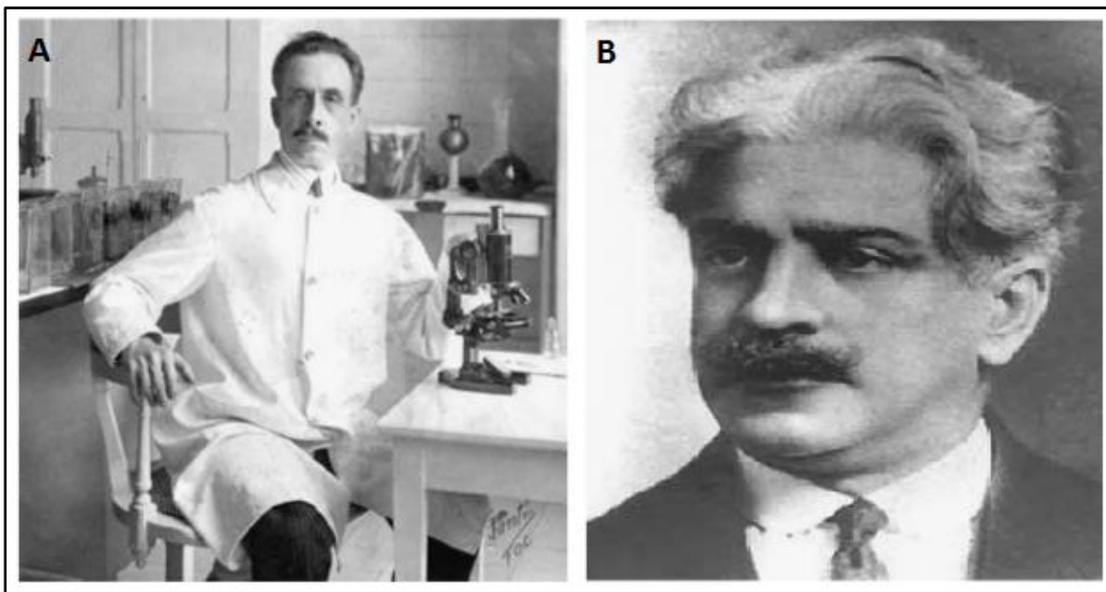


Figura 1 - Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (A) e Oswaldo Gonçalves Cruz (B).
Fonte: Adaptada de Steverding (2014).

A partir dessa descoberta, Chagas buscou pelo protozoário no sangue de indivíduos que residiam em casas infestadas por barbeiros, até que, no dia 14 de abril de 1909, descobriu o parasito no sangue periférico de uma criança de dois anos de idade, chamada Berenice, que tinha febre, hepatoesplenomegalia e aumento de linfonodos (CHAGAS, 1909). Desde então, Berenice é considerada o primeiro caso humano diagnosticado da DC. Alguns anos mais tarde, a nomenclatura de *Schizotrypanum cruzi* foi abandonada, trazendo novamente a designação de *Trypanosoma cruzi* (KROPF, 2006). Nos anos que se seguiram, Carlos Chagas continuou a identificar hospedeiros da doença que futuramente levaria o seu nome.

2.2 O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado pertencente ao reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (CAVALIER-SMITH, 1993; CAVALIER-SMITH, 2010; HONIGBERG, 1963; VITOR, 2012). O parasito pode ser transmitido por mais de 100 espécies de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) e possui mais de 70 hospedeiros mamíferos que fazem parte do ciclo de transmissão (ZINGALES, 2018).

O *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas: amastigota, tripomastigota e epimastigota (Figura 2). A forma tripomastigota (Figura 2A e 2B) é fusiforme, possui um flagelo que emerge de uma bolsa flagelar e se prolonga ao longo da extensão do parasito, formando uma membrana ondulante. O cinetoplasto é arredondado e possui um kDNA (DNA do cinetoplasto) condensado.

Nesta forma evolutiva, o parasito é considerado altamente infectante, sendo encontrado nos mamíferos (corrente sanguínea) e nos insetos vetores (região posterior do tubo digestivo). As formas amastigotas (Figura 2A e 2B) são intracelulares, ovaladas e possuem um núcleo relativamente grande e arredondado, e um cinetoplasto alongado, localizado entre o núcleo e o flagelo intracelular, o qual limita sua movimentação. Por fim, as epimastigotas (Figura 2C), também fusiformes, são encontradas no intestino médio dos triatomíneos. Possuem um cinetoplasto alongado, próximo à bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo, aderido ao longo do corpo celular, tornando-se livre na região anterior (OPAS, 2003; SOUZA, 1997).

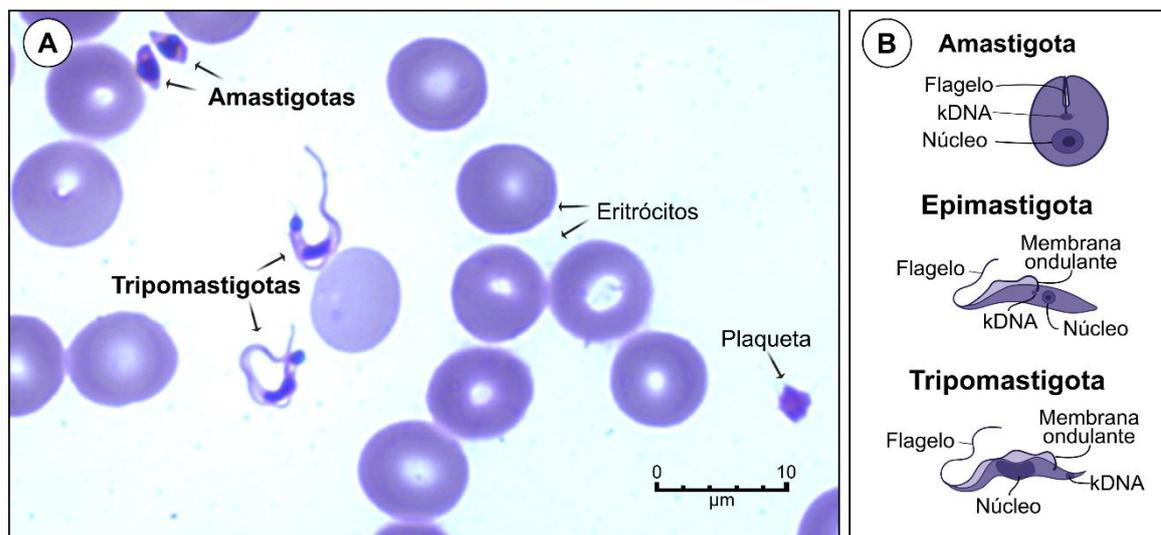


Figura 2 - Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.

Legenda: (A) Tripomastigotas e amastigotas isolados de um paciente brasileiro na fase aguda da doença de Chagas; (B) Representação esquemática das formas evolutivas do *T. cruzi* com principais estruturas presentes no protozoário.

Fonte: Acervo SerdYtech.

Seu ciclo de vida é complexo e dependente de hospedeiros invertebrados (vetores pertencentes à família Reduviidae) e vertebrados. Após o repasto sanguíneo, o vetor infectado libera em suas fezes e urina formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, que são as formas infectantes. O parasito penetra na pele através de microlesões ocasionadas por prurido no local da picada. As formas tripomastigotas são capazes de invadir as células através da formação de vacúolos, que irão se romper, e, uma vez liberados no citoplasma, vão se diferenciar em amastigotas, as quais se reproduzem por fissão binária. As formas amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas sanguíneos e rompem a célula hospedeira, podendo ser ingeridos novamente pelo inseto vetor durante repasto sanguíneo e completar o ciclo de transmissão do *T.*

cruzi, ou podem invadir novas células, continuando o ciclo intracelular (BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

A transmissão do *T. cruzi* no ciclo silvestre inclui marsupiais, roedores, morcegos, tatus e primatas (AGUILAR *et al.*, 2007), enquanto o ciclo doméstico se dá através do contato entre humanos e vetores que colonizam os ambientes doméstico e peridoméstico (DIOTAIUTI *et al.*, 1994; ZINGALES, 2018). Dentre as espécies de reservatórios, destacam-se os cães, gatos, roedores e gambás, que são considerados os mais importantes dada a sua proximidade com o homem (OPAS, 2003).

Devido a sua intensa variação genética e fenotípica, o *T. cruzi* é agrupado em sete linhagens distintas denominadas unidades de tipagem discretas (DTU – *Discrete Typing Units*), a saber: TcI a TcVI e Tcbat (ZINGALES *et al.*, 2009), as quais, por sua vez, são subdivididas em cepas caracterizadas por marcadores moleculares específicos. Assim, as cepas pertencentes a cada DTU devem ser consideradas como famílias de clones estritamente relacionadas, mas não como um único clone. Por este motivo foi criado o termo *clonet* para se referir ao conjunto de características presentes dentro de cada subgrupo de cepas (TIBAYRENC; AYALA, 1991).

2.3 TRANSMISSÃO

As principais vias de transmissão do parasito são a vetorial, oral, transfusional, congênita, por transplante de órgãos, por acidentes laboratoriais e, mais recentemente, foi introduzida a possibilidade da existência de transmissão sexual (ALMEIDA *et al.*, 2019; ARAUJO *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2019). A transmissão vetorial é a via mais comum em países endêmicos e ocorre desde o sul dos Estados Unidos ao sul do Chile e Argentina (MONCAYO *et al.*, 2003). Por este motivo, os países do chamado Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) se uniram e criaram um acordo denominado Iniciativa Cone Sul, visando erradicar o *Triatoma infestans* (Figura 3A), principal espécie vetora em ambientes domésticos, e diminuir a transmissão vetorial do *T. cruzi* (SCHOFIELD; DIAS, 1999). Apesar dos intensos esforços na condução da Iniciativa Cone Sul, a transmissão vetorial ainda é a mais comum em zonas endêmicas do Paraguai, Argentina e Bolívia. O *T. cruzi* pode ser transmitido por mais de 100 espécies de triatomíneos (Figura 3A), popularmente conhecidos como barbeiros, chupões, fincões, chupanças, bicudos ou procotós (DIAS; COURA, 1997). Os triatomíneos são insetos hematófagos, fotofóbicos e conseqüentemente de hábitos noturnos. Habitam locais como troncos de árvores, ninhos de pássaros, fendas de casas de pau-a-pique (Figura 3B), galinheiros (Figura 3C), chiqueiros e pocilgas (Figuras 3D). Os programas de controle incentivam a redução ou

eliminação de vetores através da aplicação de inseticidas (DIAS, 2007), no entanto podem apresentar limitações e levar a reinfestação de ecótopos ou colonização por novas espécies (DIOTAIUTI *et al.*, 1994; GÜRTLER *et al.*, 2007).

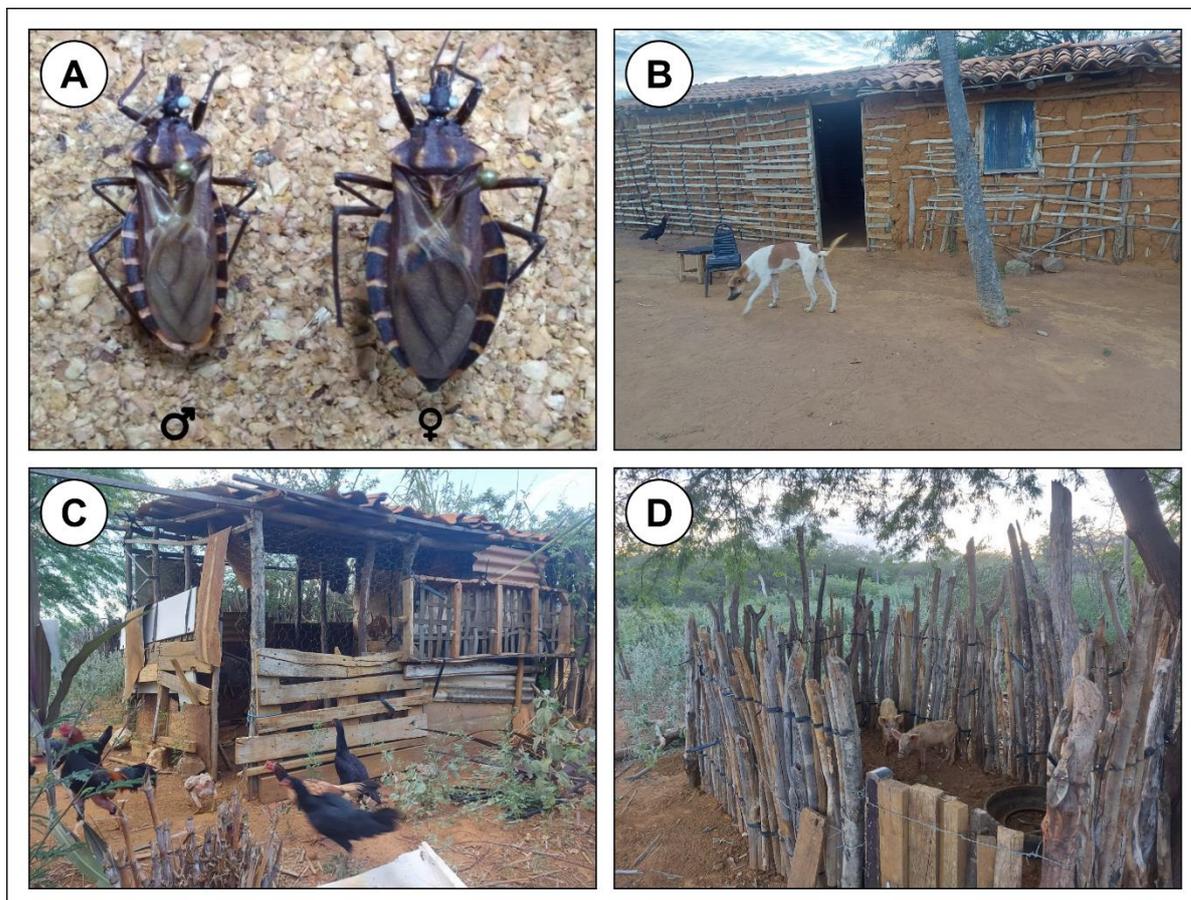


Figura 3 - Triatomíneo da espécie *Triatoma infestans* geralmente encontrados em regiões endêmicas da América do Sul e habitats normalmente usados por esta espécie.

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

Fonte: Acervo SerdYtech.

Nas décadas de 1970 e 1980, os países da América Latina foram marcados por intensos movimentos migratórios de sua população rural para os centros urbanos, contribuindo para mudança do perfil epidemiológico da DC, anteriormente considerada uma enfermidade predominantemente rural (MONCAYO *et al.*, 2003). De fato, indivíduos infectados passaram a residir em áreas periféricas das cidades, aumentando o risco de disseminação da infecção por vias de transmissão não clássicas. A transmissão por transfusão de sangue, por exemplo, cresceu

por conta desta urbanização, tanto no Brasil quanto em outros países da América Latina (DIAS *et al.*, 2016). O aumento do fluxo migratório de indivíduos infectados originários de países endêmicos para áreas indenes, como diversos países da Europa, Estados Unidos, Canadá, Austrália e Japão, também é considerado um fator de relevância para a transmissão do parasito por via não clássicas (SCHMUNIS, 1997). Este fato se tornou uma preocupação de saúde pública mundial, visto que em países não endêmicos a triagem sorológica em bancos de sangue ou bancos de órgãos não é regulamentada. Esta deficiência está sendo paulatinamente corrigida, dada a necessidade de interrupção da transmissão do parasito por estas vias.

A transmissão vertical, por sua vez, pode ocorrer através da via transplacentária, a partir da 22ª semana de gestação ou durante o parto, pelo contato com o sangue da mãe infectada. Esta via depende de diversos fatores como o nível da parasitemia materno, a virulência da cepa infectante, do sistema imune da mãe e do feto e da integridade da barreira transplacentária (CEBALLOS-POMARES, *et al.*, 2017). A transmissão vertical também recebeu maior notoriedade nos últimos anos devido a migração dos indivíduos infectados de áreas endêmicas para países indenes, uma vez que a triagem sorológica da infecção no pré-natal não é obrigatória nestas localidades. Similarmente à transmissão transfusional, esta deficiência está sendo corrigida, dada a necessidade de interrupção da transmissão do parasito pela transmissão vertical.

A via oral é considerada um mecanismo primário na transmissão do *T. cruzi*, especialmente no ciclo silvestre. Em humanos, esta pode ocorrer através da ingestão do leite materno da mãe infectada, ingestão de sangue ou carne malcozida de animais de caça infectados, ingestão de suspensão do *T. cruzi* em acidentes laboratoriais e ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com fezes ou urina de triatomíneos infectados (DIAS; NETO; LUNA; 2011). Surto de transmissão oral já foram descritos na Venezuela, Argentina, Colômbia e Bolívia, (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009; NOYA *et al.*, 2015; STORINO; JÖRG, 1994; VARGAS *et al.*, 2011) e em diferentes localidades do Brasil (ANDRADE *et al.*, 2011; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; STEINDEL *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 1988; VARGAS *et al.*, 2018), sendo em sua maioria associados ao consumo de alimentos e bebidas contaminados. Quando comparada à via vetorial, a infecção pela via oral apresenta uma maior taxa de mortalidade (8–35%) (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Atualmente, no Brasil, esta é a via de maior importância epidemiológica, com destaque para a região norte do país (SANTOS *et al.*, 2020).

2.4 CLÍNICA

A doença de Chagas apresenta as fases aguda e crônica. A aguda tem início em um período de 1 a 2 semanas pós-infecção e pode durar até 3 meses. A fase crônica vem em seguida, sendo que nesta, os indivíduos podem permanecer assintomáticos por longos períodos ou apresentar sintomas clínicos.

2.4.1 Fase aguda

Caracteriza-se por elevada parasitemia, permitindo a detecção de tripomastigotas circulantes através da microscopia. Em 90% dos casos, os indivíduos são assintomáticos (MURCIA *et al.*, 2013), todavia, quando apresentam sintomas, estes são considerados inespecíficos, como febre, mal-estar e linfadenopatia, sendo comuns a outras infecções (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015; PRATA, 2001). No caso da transmissão vetorial, o período de incubação pode variar de 4 a 15 dias (DIAS *et al.*, 2016) e o parasito penetra na pele através de microlesões ocasionando a formação de uma zona eritematosa denominada chagoma de inoculação (Figura 4A). Quando a porta de entrada é a conjuntiva ocular, a manifestação clássica é o sinal de Romana (Figura 4B), um edema indolor, bpalpebral e unilateral (DIAS *et al.*, 2015; MURCIA *et al.*, 2013; PRATA, 2001).

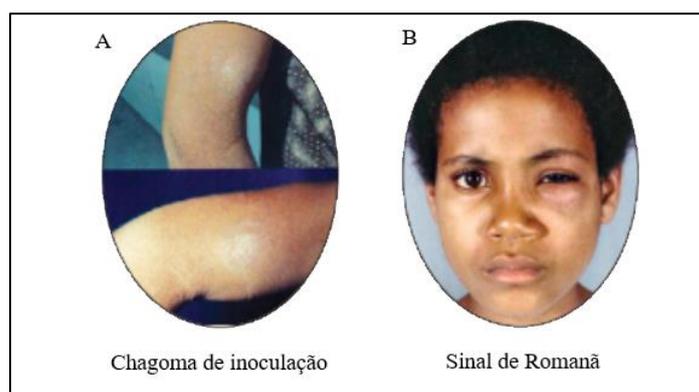


Figura 4 – Formação do chagoma de inoculação (A) e do sinal de Romana (B).

Fonte: Adaptada de Rassi; Rassi; Marin-Neto (2010).

2.4.2 Fase crônica

Em 90% dos casos, as manifestações da fase aguda se resolvem espontaneamente, mesmo que o indivíduo não seja submetido à tratamento específico. Dentre estes, estima-se que 60-70%

não desenvolverão qualquer sintomatologia relacionada à infecção ao longo de suas vidas (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Estes indivíduos caracterizam-se por apresentarem sorologia positiva e ausência de alterações no eletrocardiograma e nos exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon. A estes casos dá-se o nome de forma crônica indeterminada da DC. Contudo, 30-40% dos portadores desenvolvem alguma sintomatologia relacionada à infecção, podendo apresentar alterações cardíacas, digestivas, neurológicas ou mistas (DUTRA *et al.*, 2009; PRATA, 2001).

2.4.2.1 *Forma cardíaca*

A forma cardíaca é a manifestação mais grave e comum da DC e acomete 20-30% dos indivíduos infectados (RASSI; RASSI; REZENDE, 2012). Geralmente, resulta em arritmias, insuficiência cardíaca, tromboembolias e morte súbita. Estas manifestações são ocasionadas por um processo inflamatório em que células do sistema imune causam a destruição das fibras cardíacas, levando a uma miocardite fibrosante (RASSI; RASSI; LITTLE, 2000). Com o passar dos anos, os portadores desta forma clínica podem desenvolver cardiomegalia, a qual é caracterizada por aumento do órgão e insuficiência progressiva de suas funções (Figura 5).

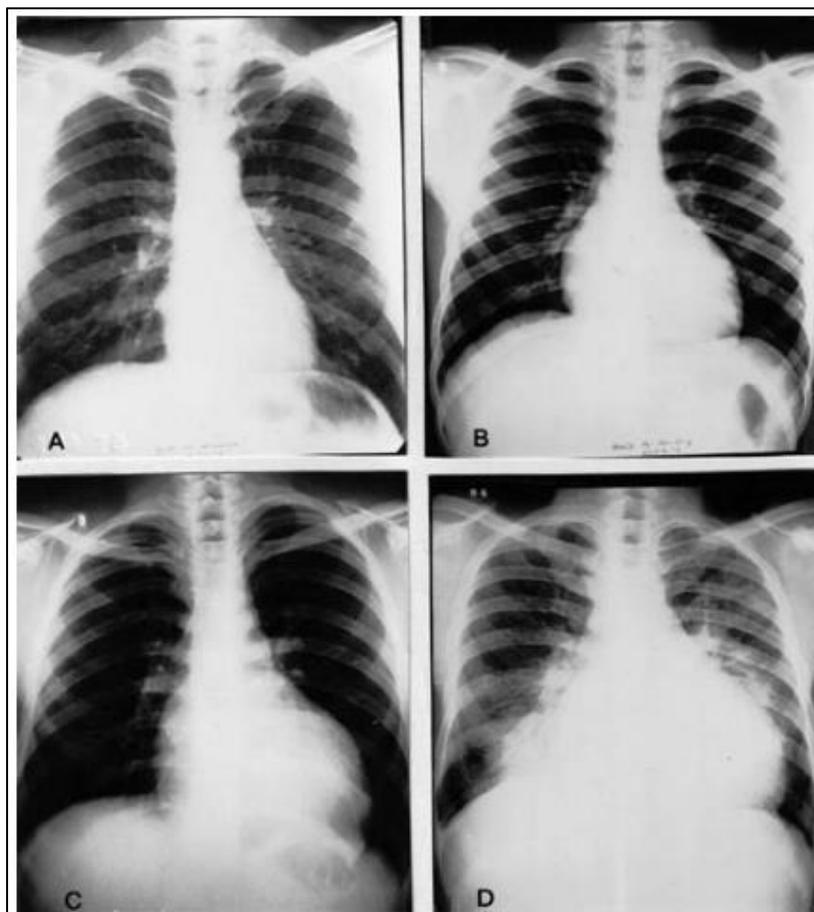


Figura 5 - Raio-X torácico de indivíduos acometidos pela forma cardíaca da doença de Chagas.

Legenda: Normal (A); Cardiomegalia leve (B); Cardiomegalia moderada (C); Cardiomegalia severa com congestão pulmonar (D).

Fonte: Tarleton *et al.* (2007).

2.4.2.2 Forma digestiva

As manifestações digestivas mais comuns são o megaesôfago e o megacólon (Figura 6), as quais podem apresentar aumento luminal e hipertrofia muscular (DUTRA *et al.*, 2009). Os sintomas iniciais são resumidos à disfagia e constipação, porém uma vez que a doença causa danos ao sistema nervoso autônomo, outras disfunções do sistema gastrointestinal podem ser observadas, como anormalidades nas glândulas salivares, estômago, duodeno e fígado (DIAS *et al.*, 2016). São observadas alterações nas funções motora, secretora e absorptiva do esôfago e do restante do trato gastrointestinal. Cerca de 10-15% dos infectados desenvolvem a forma digestiva, e é mais frequentemente observada no Brasil, Argentina, Chile e Bolívia (RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

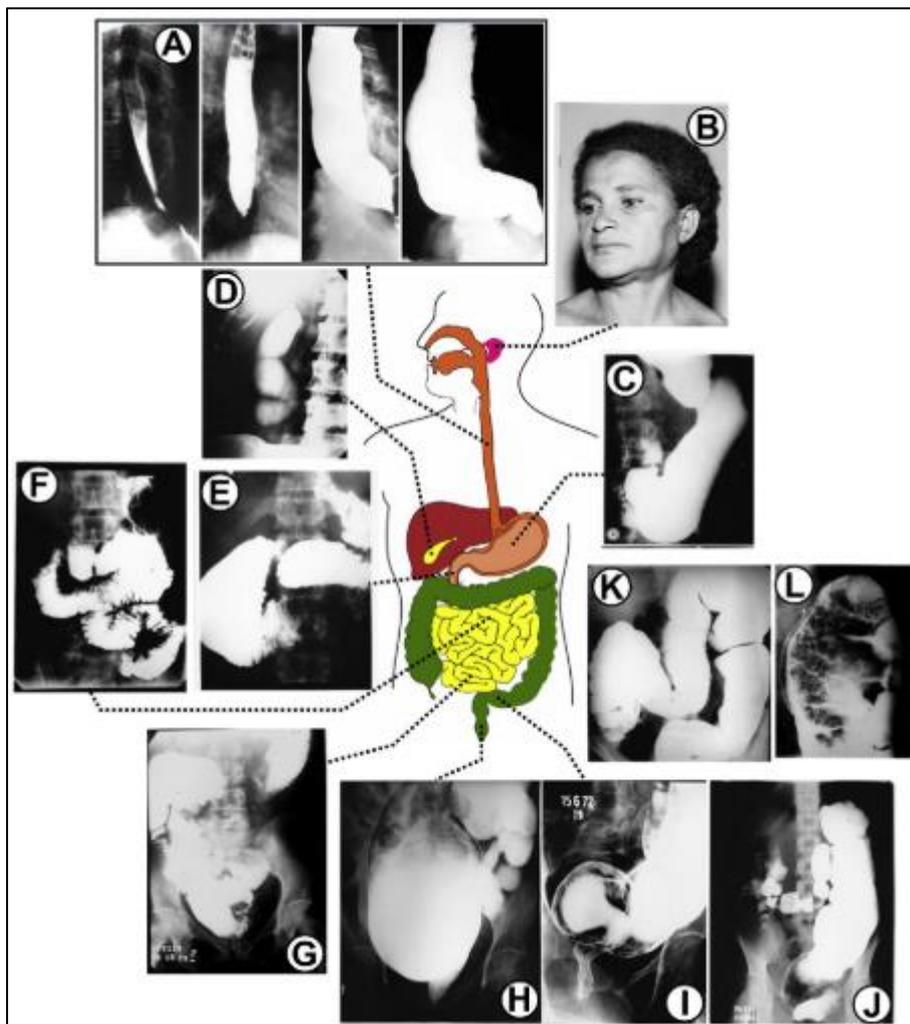


Figura 6 - Manifestações gastrointestinais da DC crônica. (A) Megaesôfago (grupos I, II, III e IV); (B) Hipertrofia de parótidas em paciente com megaesôfago; (C) Megaestômago associado ao megaesôfago grupo IV; (D) Colecistomegalia; (E) Megaduodeno; (F) Megajejuno; (G) Megaíleo; (H) Megareto; (I) Megasigmóide; (J) Megaretosigmóide; (K) Megacólon total; (L) Fecaloma. C, D, E, F e G são manifestações raras.

Fonte: Rassi; Rassi; Rezende (2012).

2.5 TRATAMENTO

Atualmente há dois fármacos antiparasitários disponíveis para o tratamento parasitário da DC: o benzonidazol e o nifurtimox. Ambas são mais eficazes quando utilizadas na fase aguda, apresentando uma taxa de cura que varia de 50% a 80% (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Na América Latina, o medicamento mais empregado é o benzonidazol (MURCIA *et al.*, 2013), apesar de ambos estarem disponíveis (BATISTA *et al.*, 2019). Na fase aguda, recomenda-se o tratamento em todos os casos e o mais brevemente possível, assim como em casos de transmissão congênita (DIAS *et al.*, 2015). Já na fase crônica o tratamento medicamentoso deve ser pensado com mais cautela, e recomenda-se o tratamento apenas de indivíduos sem

acometimento cardíaco e/ou digestivo (BRASIL, 2018; OPAS, 2019). Uma das limitações do tratamento é a presença de significativas reações adversas, como neuropatia periférica, reações cutâneas e granulocitopenia para o benzonidazol e dores abdominais, náuseas, vômito e perda de peso para o nifurtimox. Em alguns casos, ainda podem ocorrer reações neurológicas como desorientação, perda de memória, insônia, espasmos e convulsões, que desaparecem com redução da dose ou interrupção do tratamento (MURCIA *et al.*, 2013). A cura da doença depende de alguns fatores, como a fase e duração da doença, idade do indivíduo, duração do tratamento e susceptibilidade da cepa infectante ao medicamento (DIAS *et al.*, 2016), porém inexistente uma metodologia que possa ser utilizada com segurança para atestar a cura parasitológica dos indivíduos tratados.

2.6 EPIDEMIOLOGIA

Atualmente estima-se que 6-7 milhões de indivíduos estejam infectados pelo *T. cruzi* no mundo, causando até 7.500 óbitos anuais (WHO, 2019). Por conta de sua ampla distribuição, 75 milhões de indivíduos que residem entre o sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina e Chile correm risco de infecção por via vetorial (COURA; DIAS, 2009).

Apesar de ser prevalente entre o sul dos Estados Unidos ao sul da América Latina, a DC não está restrita apenas a estas localidades. Inicialmente, sua distribuição geográfica se limitava aos continentes americanos, onde há mais de 140 espécies documentadas do vetor (DIAS, *et al.*, 2016), combinado à existência de zonas rurais e condições precárias de moradia (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Devido ao intenso processo de migração, o perfil epidemiológico da DC mudou ao longo das últimas décadas, de forma que a doença se espalhou para outros países (DIAS *et al.*, 2016), se tornando um problema de saúde pública mundial. Nos últimos anos, a infecção se espalhou para países indenes, como Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e diversas localidades da Europa (COURA; VIÑAS, 2010) (Figura 7). A migração de áreas rurais para os centros urbanos (êxodo rural), que ocorreu nos últimos 50 anos, também consistiu em um fator determinante para a mudança do perfil epidemiológico da DC (BERN, 2015).

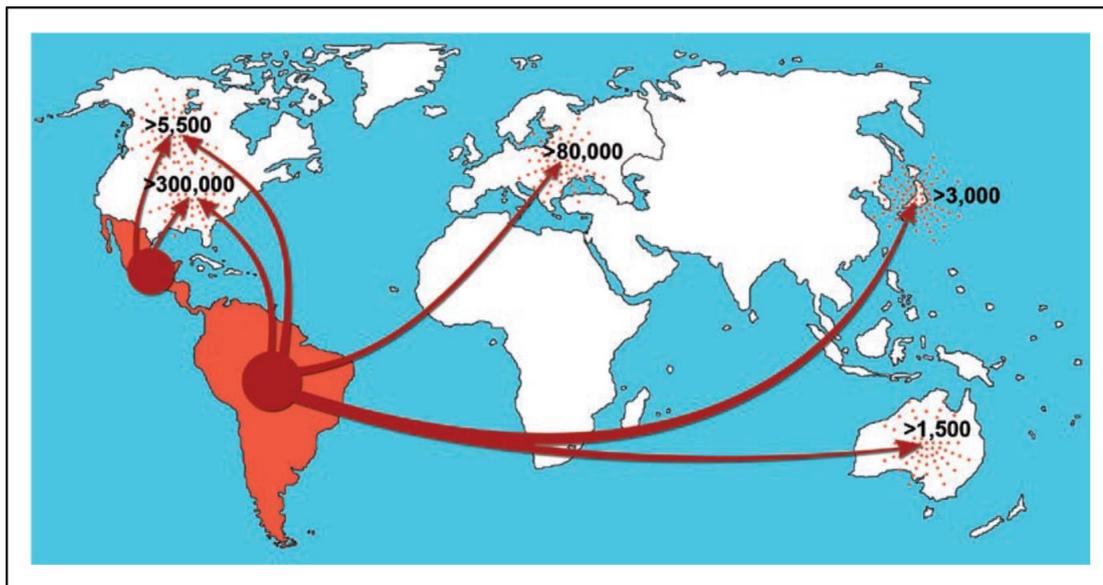


Figura 7 - Rotas de migração de indivíduos infectados provenientes de países endêmicos para países indenes.

Fonte: Coura; Viñas (2010).

Além da migração, o desmatamento, mudanças climáticas e condições precárias de moradia são fatores determinantes para a transmissão do *T. cruzi* e manutenção da DC em áreas endêmicas (DIAS *et al.*, 2016). Ações antrópicas de desmatamento levam ao aumento do risco de infecção, por aproximar o homem aos ciclos doméstico, peridoméstico e silvestre (Figura 8) (COURA, 2013). Por esta razão, o desenvolvimento de testes diagnósticos capazes de identificar a infecção em animais domésticos e silvestres é de extrema importância na vigilância da DC tanto em áreas endêmicas quanto não endêmicas.

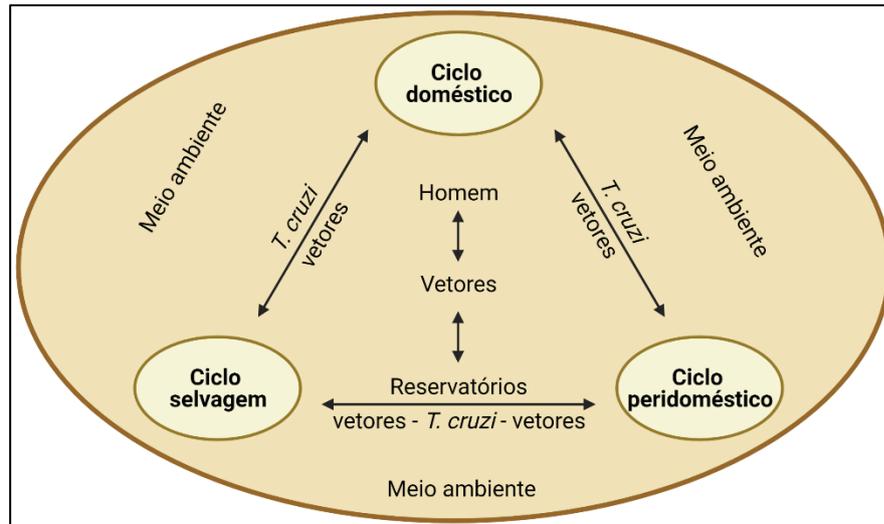


Figura 8 - Relação entre os ciclos silvestre, doméstico e peridoméstico da transmissão do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Adaptado de Coura (2013, tradução nossa).

2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da infecção causada pelo *T. cruzi* é laborioso e depende de fatores como o histórico epidemiológico, presença de sinais e sintomas clínicos, a fase da doença em que o indivíduo se encontra, nível de parasitemia e o método de escolha para o diagnóstico (DIAS *et al.*, 2016).

Na fase aguda há uma elevada parasitemia, portanto as metodologias utilizadas são aquelas que evidenciam a presença das formas circulantes do parasito (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009), como os exames parasitológicos diretos e indiretos. Com o objetivo de aumentar a sensibilidade diagnóstica, recomenda-se que métodos diretos, tais como a gota espessa e o esfregaço sanguíneo corado, sejam associados a algum método de concentração, como o microhematócrito, Strout ou creme leucocitário (LUQUETTI; SCHMUNIS, 2010). Os exames parasitológicos indiretos também são uma alternativa no diagnóstico da infecção aguda, como o xenodiagnóstico e o hemocultivo. O xenodiagnóstico é baseado na infecção experimental de um vetor após o repasto sanguíneo em indivíduos com suspeita de infecção (DIAS, 1940). O hemocultivo já foi recomendado em associação ao xenodiagnóstico (CHIARI *et al.*, 1989). Contudo, estas técnicas são laboriosas e necessitam de instalações específicas. Portanto, atualmente, não são mais empregadas na rotina laboratorial. Também considerado um método parasitológico, a reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada por ser mais sensível que os demais métodos parasitológicos indiretos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). O diagnóstico molecular é mais usual em casos de transmissão congênita à recém-nascidos, casos

de infecção oral, em indivíduos transplantados, no monitoramento da reativação em indivíduos imunossuprimidos e para avaliação da resposta ao tratamento no controle de falha terapêutica (SCHIJMAN, 2018).

Na fase crônica, a parasitemia diminui drasticamente, de modo que os testes parasitológicos perdem sensibilidade e passam a ser desaconselhados na rotina laboratorial. Por outro lado, a produção de anticorpos específicos aumenta e atinge títulos capazes de serem detectados através de testes sorológicos (GOMES, 1997). Por este motivo, o diagnóstico nesta fase baseia-se em metodologias sorológicas indiretas, como a imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI), testes imunocromatográficos rápidos, ensaios quimiluminescentes (CLIA) e ensaios de imunoabsorção (ELISA), sendo este último o mais utilizado devido a possibilidade de automação, baixo custo e testagem de diversos indivíduos simultaneamente (SANTOS *et al.*, 2016a). Ainda assim, o desempenho do ELISA varia em razão da preparação antigênica utilizada (GADELHA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2016a), da variedade genética e fenotípica do *T. cruzi* (ZINGALES, 2018), da prevalência da doença (LEEFLANG; BOSSUYT; IRWIG, 2009; LEEFLANG *et al.*, 2013) e da resposta imunológica dos indivíduos infectados (MARTIN *et al.*, 2014; VERANI *et al.*, 2009).

Já que não existe um ensaio definido como padrão-ouro para o diagnóstico da DC na fase crônica, recomenda-se a utilização de dois testes distintos (WHO, 2002), sendo um de alta sensibilidade e outro de alta especificidade (DIAS *et al.*, 2016). A concordância dos resultados define o indivíduo como negativo ou positivo. Nos casos discordantes, uma terceira metodologia deve ser usada ou uma nova amostra deve ser coletada para repetição dos testes e definição do estado sorológico do indivíduo. Se esta condição se repetir, a amostra deve ser encaminhada para um laboratório de referência (DIAS *et al.*, 2016), onde serão realizados testes como PCR e Western blot (GOMES *et al.*, 2009). Entretanto, em virtude da descontinuidade de produção do único teste de *Western blot* disponível no mercado mundial, o TESABlot (BioMeriêux, Brasil), muitos laboratórios optam por realizar um terceiro teste (ELISA, HAI ou IFI) para confirmação diagnóstica.

2.7.1 Metodologias sorológicas

Dentre os testes sorológicos, as metodologias de ampla utilização são o ELISA, a IFI e a HAI. A imunofluorescência indireta se baseia na interação de anticorpos anti-*T. cruzi* presentes na amostra com formas epimastigotas do parasito fixadas em lâminas de microscopia. As lâminas são incubadas e, após etapas de lavagens, são novamente incubadas com um anticorpo secundário

(anti-IgG) conjugado à um fluoróforo, que irá emitir fluorescência quando estimulado por feixes luminosos com comprimento de onda definidos (Figura 9). Este método apresenta alta sensibilidade, no entanto, por utilizar o parasito inteiro em sua forma epimastigota, está sujeito à resultados falso-positivos por reações cruzadas, em especial com espécies do gênero *Leishmania* spp. (DALTRO *et al.*, 2019) e com o *T. rangeli* (MORAES *et al.*, 2008). Além desta desvantagem, este método é cada vez menos utilizado devido à diversas limitações, pois é laborioso, necessita de profissionais capacitados para realizar a leitura das lâminas e demanda equipamentos específicos (WHO, 2002).

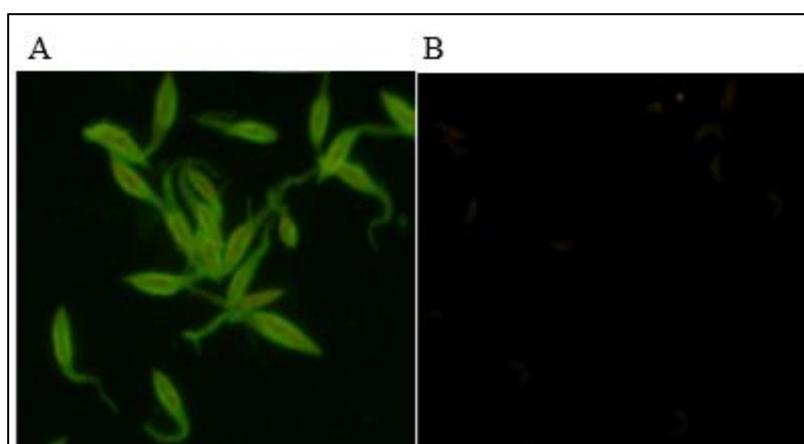


Figura 9 - Reação de imunofluorescência indireta utilizando formas epimastigotas (A) como antígenos na diluição do soro positivo de 1:80 e controle negativo (B).

Fonte: Adaptado de Moraes *et al.* (2008).

A hemaglutinação indireta (Figura 10) é uma técnica que se fundamenta na aglutinação de hemácias sensibilizadas com antígenos do *T. cruzi* na presença de amostras séricas de indivíduos infectados pelo parasito. Nos testes com resultado positivo é possível a visualização a olho nu da formação de um “manto” no poço, que é composto pela malha de imunocomplexos antígeno-anticorpo (BUENO; VAZ, 2007). Quando a amostra é negativa, as hemácias se sedimentam no fundo da placa, formando um “botão”. A sensibilidade deste método é menor que a da IFI ou ELISA (WHO, 2002), atingindo valores de 52,7% (GADELHA *et al.*, 2003). Apesar de simples, necessita de leitura visual, estando sujeita a erros do operador, além da realização de diluições seriadas, o que torna o teste laborioso para grandes rotinas e passível de erros durante a realização.

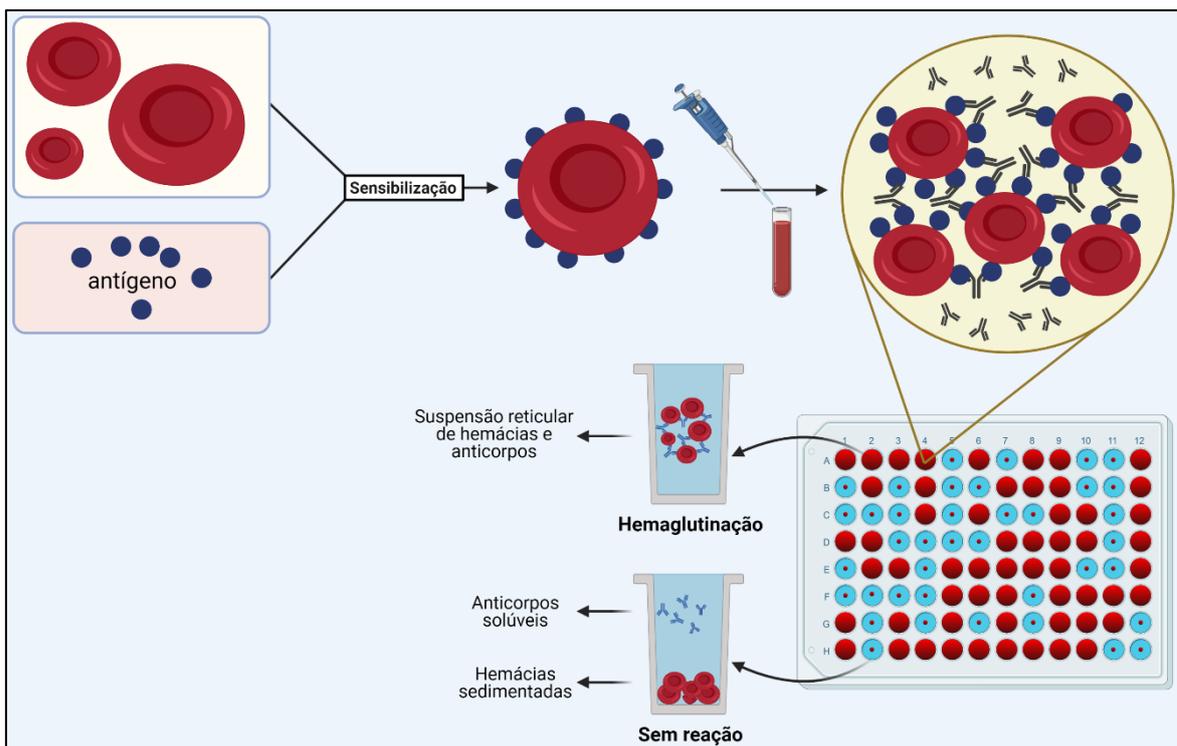


Figura 10 - Representação esquemática do teste de hemaglutinação indireta.
Fonte: Acervo SerdYtech.

O teste de ELISA é a metodologia de escolha para o diagnóstico na fase crônica, devido ao seu baixo custo, possibilidade de automação, testagem de diversos indivíduos concomitantemente e simplicidade em sua execução (NAKAZAWA *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2016a). O método de ELISA mais utilizado é o indireto (Figura 11), que se baseia na adsorção de antígenos à fase sólida de uma microplaca de poliestireno de 96 poços. Após a sensibilização das microplacas, o material de análise é colocado em contato com o antígeno adsorvido e incubado para que ocorra a interação antígeno-anticorpo. Após esta interação, um segundo anticorpo (anti-IgG) conjugado à uma enzima é adicionado e a reação é incubada novamente. Caso haja ligação entre estes anticorpos, esta será revelada na etapa de adição com substrato enzimático, através do surgimento de cor, que será quantificada em um espectrofotômetro de microplacas.

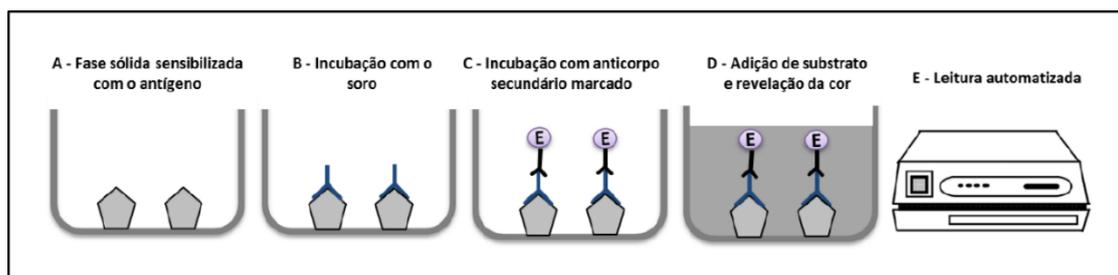


Figura 11 - Representação esquemática do teste de ELISA indireto.

Fonte: Santos (2016).

O primeiro teste de ELISA para diagnóstico da DC foi padronizado em 1975, com matriz composta por antígenos solúveis do *T. cruzi* adsorvidos em microplacas (VOLLER *et al.*, 1975). Devido aos avanços tecnológicos e de engenharia genética, uma variedade de preparações antigênicas pôde ser aplicada aos ensaios de ELISA. Os extratos brutos ou semipurificados, que são utilizados nos ensaios tradicionais, podem resultar em problemas na padronização, reprodutibilidade e possibilidade de reatividade cruzada, principalmente com espécies do gênero *Leishmania* spp. e com o *T. rangeli* (ARAUJO, 1986; DALTRO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2012). Estas reações podem ser reduzidas com a utilização de antígenos recombinantes ou recombinantes, que são mais robustos e desenvolvidos através de técnicas da engenharia genética. O uso de antígenos recombinantes para o diagnóstico da DC crônica continua sendo estudado através de diversas pesquisas, e foi observado que estas moléculas aumentam a especificidade do ensaio (AGUIRRE *et al.*, 2006; CAMUSSONE *et al.*, 2009). Desde então, misturas de diferentes antígenos recombinantes foram avaliadas em diferentes plataformas diagnósticas (ALMEIDA *et al.*, 1990; CAMUSSONE *et al.*, 2009; MONCAYO; LUQUETTI, 1990; VERGARA *et al.*, 1991). Apesar destes avanços e dada a variabilidade antigênica do *T. cruzi*, resultados falso-negativos continuaram a ser evidenciados, demonstrando a limitação da monotonia de epítomos altamente conservados presentes nestes antígenos (FRASCH *et al.*, 1991). Para reduzir eventuais reações cruzadas ou falso-negativas, sugere-se a utilização de antígenos recombinantes quiméricos, formados por epítomos conservados e repetitivos de diversas proteínas do parasito em uma única molécula (CAMUSSONE *et al.*, 2009). Nos últimos anos, quatro antígenos quiméricos (IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4) foram desenvolvidos e seu potencial diagnóstico foi extensamente avaliado (CORDEIRO *et al.*, 2020; DALTRO *et al.*, 2019; DEL-REI *et al.*, 2019; DOPICO *et al.*, 2019; LEONY *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2016b; SANTOS *et al.*, 2017a; SANTOS *et al.*, 2017b; SANTOS *et al.*, 2018; SILVA, 2016; SILVA *et al.*, 2020).

2.8 ANTÍGENOS IBMP

Quatro antígenos quiméricos, compostos por sequências conservadas e repetitivas de diferentes proteínas do *T. cruzi*, foram desenvolvidos e purificados pelo nosso grupo através de técnicas de engenharia genética (SANTOS *et al.*, 2016b). Estas moléculas foram denominadas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 em homenagem ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná, local onde foram expressas e purificadas.

Os ensaios utilizando essas moléculas foram padronizados e seu potencial diagnóstico foi avaliado para detectar a DC crônica, inicialmente em humanos através do ELISA e microarranjo líquido. Este estudo utilizou um total de 280 amostras positivas e 20 negativas para a DC, e as moléculas apresentaram valores de área abaixo da curva (AUC) superiores a 98%, indicando uma alta capacidade de diferenciação entre indivíduos positivos e negativos para a DC (SANTOS *et al.*, 2016b). Tendo em vista os resultados do estudo de fase I, os quatro antígenos IBMP se mostraram aptos para compor um estudo de fase II, que objetivou determinar os parâmetros de desempenhos dos ensaios, os quais foram realizados em diferentes etapas, com amostras bem caracterizadas e tamanho amostral estatisticamente determinado.

Inicialmente, o ensaio de escolha foi o ELISA, sendo utilizadas 857 amostras positivas para a DC crônica, 689 negativas e 1.079 amostras positivas para outras doenças infecto-parasitárias, com finalidade de avaliar a reatividade cruzada. Todos os antígenos apresentaram valores de sensibilidade superiores a 94% e especificidade acima de 99%. Adicionalmente, os índices de reatividade cruzada encontrados foram baixos, sendo observado que o desempenho diagnóstico dos antígenos quiméricos foi superior ao de testes comerciais disponíveis no Brasil naquela ocasião. Além disso, foram observadas elevadas taxas de reprodutibilidade intra-teste, inter-teste e inter-laboratorial (SANTOS *et al.*, 2017a). Em seguida, outras plataformas diagnósticas foram avaliadas, como o microarranjo líquido (SANTOS *et al.*, 2017b) e a imunocromatografia de duplo percurso (SILVA, 2016). Resultados semelhantes aos do ELISA foram encontrados em ambas as plataformas diagnósticas.

No estudo que utilizou imunocromatografia de duplo percurso foi observado que os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 se destacaram em valores de acurácia superiores a 99% (SILVA, 2016) e, por este motivo, foram selecionados para compor outros dois estudos, que tiveram como finalidade analisar o comportamento destas moléculas frente à diferentes DTUs do *T. cruzi*. A primeira avaliação foi realizada em áreas de alta endemicidade, utilizando amostras séricas de indivíduos positivos e negativos para a DC provenientes da América Latina, mais especificamente de diferentes províncias da Argentina, Bolívia e Paraguai (DEL-REI *et al.*,

2019). Em seguida, foi feito um estudo em área de baixa endemicidade, com amostras de imigrantes latino-americanos residentes em Barcelona, Espanha (DOPICO *et al.*, 2019). Em ambos os estudos, os parâmetros de desempenho encontrados foram semelhantes aos encontrados anteriormente, sugerindo que os antígenos IBMP podem detectar anticorpos IgG anti-*T. cruzi* independente da cepa infectante.

Visto que não há um teste de referência para o diagnóstico da DC crônica, esses estudos foram conduzidos utilizando dois testes comerciais com preparações antigênicas e/ou metodologias distintas para definição do perfil sorológico das amostras usadas. Desta maneira, os parâmetros de desempenho de novos métodos diagnósticos podem ser enviesados por falta de um padrão-ouro para comparação. Por esta razão, foi realizada uma análise de classe latente (LCA), ferramenta estatística utilizada para avaliar testes na ausência de um padrão-ouro, de maneira que o método de análise aproxima aquele resultado do estado real da doença. Uma combinação de resultados de testes origina um *status* de classe latente, ou *status* da doença. Este modelo de análise já foi utilizado por outros autores anteriormente (ANDRADE; GONTIJO, 2008; CASTRO-SESQUEN *et al.*, 2021; MACHADO DE ASSIS; RABELLO; WERNECK, 2012). No estudo, as amostras passaram por avaliações individuais para cada antígeno IBMP, e a combinação dos resultados dos quatro antígenos foi utilizada para definir o *status* de cada amostra como positiva ou negativa para a DC (SANTOS *et al.*, 2018), indicando valores de acurácia compatíveis aos estudos realizados anteriormente (SANTOS *et al.*, 2017a; SANTOS *et al.*, 2017b). Utilizando a LCA como padrão-ouro para o diagnóstico da DC crônica, outro estudo avaliou a reatividade cruzada dos antígenos IBMP com um grande quantitativo amostral de indivíduos infectados com leishmaniose tegumentar (n = 629) e visceral (n = 200). Os antígenos IBMP apresentaram ausência de reatividade cruzada ou valores inferiores aos apresentados por diferentes testes comerciais também avaliados (DALTRO *et al.*, 2019). Mais recentemente, os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 foram selecionados para compor um estudo de fase I através da plataforma de imunoensaio de fluxo lateral (LFA, *lateral flow assay*), utilizando amostras representativas de diferentes formas clínicas da DC e de diferentes áreas endêmicas do Brasil. Neste estudo, foi observada uma 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 utilizando 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 diagnósticos para a doença nestes animais, os

antígenos IBMP também foram submetidos a uma avaliação do potencial de detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em soros de cães, sendo observado que as quatro moléculas apresentam alta capacidade diagnóstica (LEONY *et al.*, 2019).

Com base nos resultados obtidos usando os antígenos IBMP, resolvemos avaliar o desempenho diagnóstico destas moléculas utilizando a plataforma de ELISA sanduíche duplo-antígeno, a qual será abordada a seguir.

2.9 ELISA SANDUÍCHE DUPLO-ANTÍGENO (DAS-ELISA)

O ELISA sanduíche duplo-antígeno é uma variação do ELISA sanduíche que utiliza o próprio antígeno marcado como agente de detecção, formando um “sanduíche” do anticorpo entre os antígenos (YANG *et al.*, 2006). Desta forma, este teste não possui a limitação de detecção de anticorpos classe-específicos ou espécie-específicos, aumentando a sensibilidade do ensaio e podendo ser utilizado para detecção de anticorpos em soros de diferentes origens, além da humana (HU *et al.*, 2008; SAS *et al.*, 2018). Assim, com a utilização dos antígenos IBMP marcados com peroxidase, o mesmo teste poderá identificar anticorpos anti-*T. cruzi* em seres humanos e em seus reservatórios domésticos e silvestres, tendo em vista que para estes últimos não há testes comerciais disponíveis para esta finalidade. Alguns estudos envolvendo essa metodologia estão disponíveis na literatura (Quadro 1).

Patógeno	Marcação do antígeno	Referência
Verocitotoxina de <i>E. coli</i>	Biotina	MIYAZAWA <i>et al.</i> , 1999
Doença de Chagas	HRP	GOMES <i>et al.</i> , 2001
SARS-CoV	HRP	CHEN <i>et al.</i> , 2005
Vírus da raiva	HRP	YANG <i>et al.</i> , 2006
Hepatite B	HRP	DENG <i>et al.</i> , 2008
Hepatite E	HRP	HU <i>et al.</i> , 2008
Hepatite Delta	HRP	XIE <i>et al.</i> , 2009
Hepatite B	HRP	LI <i>et al.</i> , 2010
Influenza A	HRP	WATCHARATANYATIP <i>et al.</i> , 2010
Hepatite E	HRP	DONG <i>et al.</i> , 2011
Hepatite C	Biotina	HE <i>et al.</i> , 2011
Circovírus suíno	HRP	GE <i>et al.</i> , 2012
Bunyavírus	HRP	JIAO <i>et al.</i> , 2012
Clamídia	Biotina	HORNER <i>et al.</i> , 2016
Varicela-zoster	HRP	LIU <i>et al.</i> , 2016
Febre hemorrágica da Crimeia-Congo	HRP	SAS <i>et al.</i> , 2018
Sífilis	HRP	WANG <i>et al.</i> , 2019
Anaplasmosse bovina	Biotina	SARLI <i>et al.</i> , 2020

Quadro 1 - Ensaios de ELISA sanduíche duplo-antígeno disponíveis na literatura classificados por ano de publicação.

Já foram reportados bons parâmetros de desempenho nos testes diagnósticos ao utilizar este tipo de metodologia (CHEN *et al.*, 2005; DENG *et al.*, 2008; GE *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2008; JIAO *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2016; WATCHARATANYATIP *et al.*, 2010; XIE *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2006), e a ausência de reação de fundo (*background*) nas amostras negativas (GE *et al.*, 2012; SAS *et al.*, 2018), indicando um baixo número de ligações inespecíficas. No entanto, não foi avaliado se indivíduos com baixos títulos de anticorpos específicos são corretamente diagnosticados usando esta metodologia.

Nesse tipo de ensaio (Figura 12), os anticorpos da amostra irão se ligar aos antígenos sensibilizados da fase sólida através de um de seus sítios de ligação e, posteriormente, se ligarão aos antígenos conjugados através do outro sítio. Desta forma, mesmo que haja a ligação de anticorpos inespecíficos na fase sólida, estes não irão se ligar ao antígeno conjugado, na fase líquida, garantindo um *background* baixo ao ensaio (GE *et al.*, 2012). Para além, a sensibilidade pode ser elevada por não haver diluição de amostras, enquanto os testes indiretos convencionais a necessitam para o aumento da especificidade, podendo assim levar à queda da sensibilidade (HE *et al.*, 2011).

Metodologia semelhante já foi desenvolvida no Brasil por Bio-Manguinhos para o diagnóstico da DC crônica. O kit EIE-Recombinante-Chagas-Bio-Manguinhos[®] foi padronizado para o diagnóstico da DC crônica utilizando os antígenos CRA (antígeno repetitivo citoplasmático) e FRA (antígeno repetitivo flagelar) recombinantes como matriz antigênica e agentes de detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* (GOMES *et al.*, 2001). Este teste apresentava sensibilidade e especificidade elevadas (GADELHA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002). No entanto, a produção do kit foi descontinuada e desde então, não foram publicados outros estudos envolvendo essa metodologia para o diagnóstico da DC.

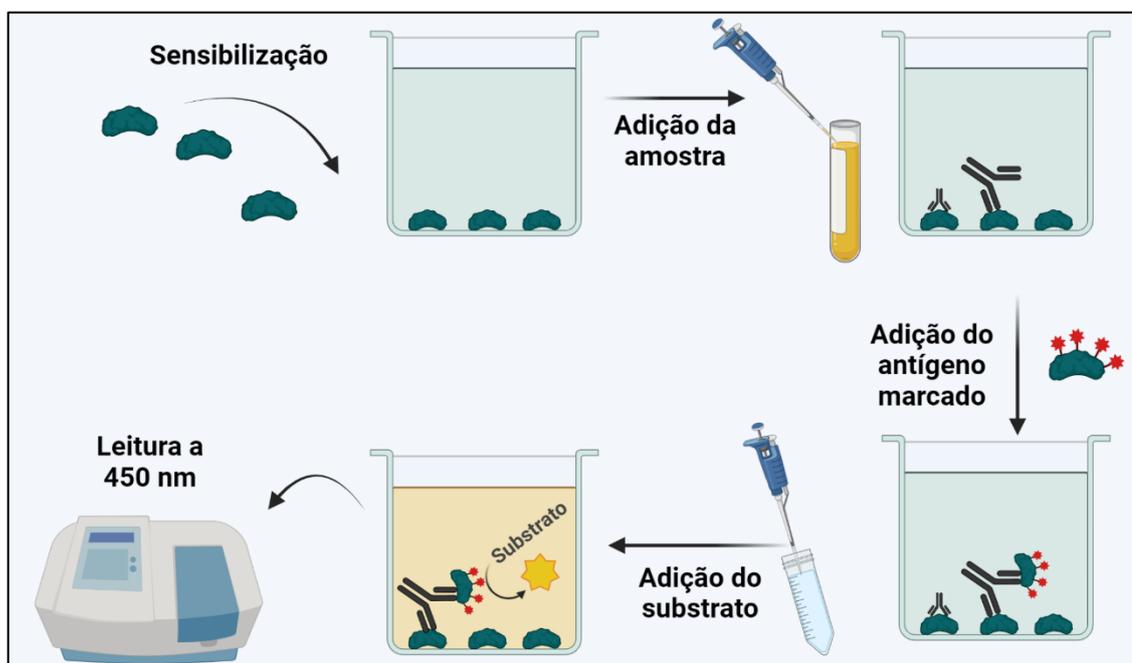


Figura 12 - Representação esquemática do ELISA sanduíche duplo-antígeno.
Fonte: Acervo SerdYtech.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e validar o desempenho diagnóstico dos antígenos recombinantes quiméricos do *T. cruzi* (IBMP-8.1, IMBP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4), como matrizes antigênicas e como agentes de detecção após conjugação à peroxidase, para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* em humanos através do ELISA sanduíche duplo-antígeno.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o teste imunoenzimático no formato ELISA sanduíche duplo-antígeno utilizando os antígenos quiméricos IBMP como matriz antigênica e como agentes de detecção após conjugação à peroxidase;
- Validar o ensaio imunoenzimático utilizando os antígenos quiméricos IBMP como agentes de detecção após conjugação à peroxidase através de soros de indivíduos infectados e não infectados pelo *T. cruzi*;
- Avaliar a reatividade cruzada do ELISA sanduíche duplo-antígeno utilizando os antígenos quiméricos IBMP com soros de indivíduos com diagnóstico positivo para outras doenças infecto-parasitárias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

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

4.2 LOCAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E PROCEDIMENTOS

Os processos de obtenção e purificação dos antígenos IBMP foram realizados por colaboradores do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). A conjugação dos antígenos à peroxidase ocorreu no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, em Bio-Manguinhos (Fiocruz-RJ). Por fim, a avaliação do potencial diagnóstico da técnica foi feita no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP; Instituto Gonçalo Moniz, IGM/Fiocruz-BA).

4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo está inserido em dois projetos maiores, denominados “Avaliação e validação do potencial diagnóstico de proteínas recombinantes para detecção de patógenos investigados pela Hemorrede do Brasil e pela triagem pré-natal do SUS” (aprovado pelo CEP do IGM/Fiocruz/BA; CAAE 67809417.0.0000.0040) e “Avaliação e validação do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do *Trypanosoma cruzi*” (aprovado pelo CEUA do IGM/Fiocruz/BA; protocolo número: 002/2017).

4.4 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES QUIMÉRICOS

Os antígenos recombinantes quiméricos foram expressos e purificados por nossos colaboradores através de técnicas de engenharia genética no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). Brevemente, os antígenos foram clonados em vetores pET28a e expressos em *Escherichia coli* BL21-Star. Após indução, as bactérias foram lisadas e o homogenato contendo as proteínas foi separado por centrifugação, para posterior purificação por cromatografia de troca iônica (SANTOS *et al.*, 2016b). Após este processo, os antígenos foram enviados ao LASP (Fiocruz-BA) para dar início aos imunoenaios.

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

Alíquotas dos antígenos foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, para avaliação de sua integridade. Os géis foram submetidos à eletroforese com 20 mA de corrente e coloração pelo Coomassie Blue R250 (Bio-Rad, EUA). O marcador de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope™ Prestained Standards (BioRad, EUA).

4.6 CONJUGAÇÃO DOS ANTÍGENOS À PEROXIDASE

A conjugação dos antígenos à peroxidase foi realizada em colaboração com o Dr. Edimilson Domingos da Silva no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, em Bio-Manguinhos (Fiocruz-RJ). Detalhes técnicos da conjugação não podem ser revelados devido a segredo industrial. Contudo, foi realizada a conjugação química através do método de hidrazona. Neste processo se utiliza o metaperiodato de sódio como agente oxidante da peroxidase e o borohidreto de sódio, responsável pela formação da ligação hidrazona entre a peroxidase e o antígeno quimérico.

4.7 PAINÉIS SOROLÓGICOS

4.7.1 Dimensionamento amostral

Devido às características deste estudo de validação de métodos (fase I ou prova-de-conceito), não é necessária a determinação estatística do dimensionamento amostral, sendo a amostragem, portanto, de conveniência (SANTOS *et al.*, 2016b). Para este tipo de estudo, amostras representativas do agravo em questão devem ser utilizadas, ou seja, amostras de indivíduos residentes em regiões geográficas e em variadas formas clínicas da DC crônica.

4.7.2 Obtenção e caracterização do painel sorológico

Um total de 311 amostras positivas para a DC foram cedidas para este estudo pelo Laboratório Central de Saúde Pública Profº. Gonçalo Moniz (LACEN/BA). Estas amostras foram previamente caracterizadas pelo LACEN-BA utilizando ensaios de ELISA e quimiluminescência indiretas. Também foi utilizado um painel de 205 amostras provenientes da Fundação de

Hematologia e Hemoterapia da Bahia (Fundação HEMOBA). Todas estas amostras apresentaram resultados negativos para a DC, bem como para outros agravos triados pela instituição. Similarmente, estas amostras foram previamente caracterizadas pela Instituição cedente através de ensaios de quimiluminescência indireta. Adicionalmente, 68 amostras foram selecionadas de parcerias prévias com o HEMOBA e com a Universidade Federal do Rio Grande do Norte para avaliar a reatividade cruzada do IBMP-DAS-ELISA com as seguintes doenças infecto-parasitárias: hepatite B, hepatite C, HIV, HTLV, sífilis e leishmaniose visceral.

As alíquotas cedidas pelo LACEN-BA foram obtidas entre os meses de setembro e outubro de 2019, e os dados coletados foram: *cut-off* e densidade óptica (DO) do ELISA, índice da quimiluminescência, data de coleta e município de residência dos indivíduos. Nas visitas ao LACEN-BA, as amostras eram aliquotadas em tubos de criopreservação e devidamente identificadas com o código da soroteca do nosso grupo. Uma vez no LASP, as amostras foram armazenadas a -20° C até a realização dos imunoenaios.

Todas as amostras selecionadas para este estudo foram recharacterizadas sorologicamente pelo IBMP-ELISA indireto (Anexo 1), já padronizado em estudos prévios (DALTRO *et al.*, 2019; DEL-REI *et al.*, 2019; DOPICO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2016b; SANTOS *et al.*, 2017b). Para a definição do perfil sorológico das amostras foi utilizado o modelo de classe latente previamente estabelecido por Santos e colaboradores em 2018 (SANTOS *et al.*, 2018).

4.7.3 Critérios de inclusão amostral

Foram incluídas neste estudo amostras séricas de indivíduos positivos e negativos para a DC e outras doenças infecto-parasitárias, com resultados concordantes entre os ensaios utilizados na recharacterização do painel sorológico e amostras séricas de indivíduos positivos para outras doenças infecto-parasitárias, mas negativas para a DC.

4.7.4 Critérios de exclusão amostral

Foram excluídas do estudo amostras séricas com volumes inferiores a 300 µL, amostras com hemólise e/ou lipemia intensas e amostras com resultados discordantes entre os ensaios utilizados na recharacterização sorológica.

4.8 PADRONIZAÇÃO DO IBMP-ELISA SANDUÍCHE DUPLO-ANTÍGENO (IBMP-DAS-ELISA)

Para determinar as condições ótimas dos imunoenaios, foram avaliadas diferentes diluições dos antígenos, das amostras e dos antígenos conjugados à peroxidase através de *checkerboard titration*. Este método baseia-se na avaliação de diferentes condições dos antígenos, amostras séricas e antígenos conjugados à peroxidase, objetivando identificar a melhor forma de aplicá-los. Para a padronização, os antígenos foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (50 mM; pH=9,6) nas quantidades finais de:

- 400 ng;
- 200 ng;
- 100 ng;
- 50 ng;
- 25 ng;
- 12,5 ng;
- 6,25 ng;
- 3,125 ng;
- 1,56 ng.

Em seguida, 100 μ L dessas soluções foram distribuídos separadamente em microplacas de poliestireno de 96 cavidades e de fundo chato (UV-Star[®] Microplate, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria). Após a adição dos antígenos, 100 μ L de WellChampion[™] (lote 130703; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) foram adicionados por cavidade para sensibilização e bloqueio concomitante das microplacas. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, as placas foram esvaziadas por inversão e levadas para secagem em estufa a 37°C por 20 minutos (Marconi[®] MA032, São Paulo, Brasil). Após este período, as placas encontravam-se prontas para uso. Para a padronização dos imunoenaios foram utilizados *pools* séricos de amostras humanas previamente caracterizadas como positivas ou negativas para a DC, sendo três deles positivos e quatro negativos. As diluições séricas avaliadas foram 1:2 e 1:1, em tampão PBS (fosfato de sódio 10mM e cloreto de sódio 150mM; pH 7,4). Os *pools* séricos foram utilizados em duplicata para cada condição de antígeno, conjugado e diluição avaliada. Seis poços sem adição de antígeno (somente tampão PBS) e seis sensibilizados com o antígeno, porém, sem adição de amostra sérica (branco) foram utilizadas para análise do sinal de *background* do tampão e dos antígenos, respectivamente.

Após a sensibilização, 50 µL dos *pools* foram adicionadas em cada poço, e as placas foram seladas e incubadas em estufa a 37°C por 60 minutos (MARCONI® MA032, São Paulo, Brasil). Passado este período, as placas foram lavadas cinco vezes com 250 µL de tampão PBS-Tween (PBS-T, fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e 0,5% de Tween-20; pH 7,4) para retirada do material não adsorvido. Posteriormente, 50 µL do antígeno conjugado diluído em PBS foram adicionados aos poços. Para a padronização da reação, o conjugado foi avaliado nas diluições de 1:10.000; 1:5.000; 1:2.000; 1:1.000 e 1:500. As placas foram novamente seladas e incubadas em estufa a 37°C, desta vez por 30 minutos (MARCONI® MA032, São Paulo, Brasil). Em seguida, 100 µL do cromógeno TMB Plus (lote 111011; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) foram adicionados e as placas incubadas em temperatura ambiente sob abrigo da luz durante 10 minutos. Após a incubação, 50 µl de H₂SO₄ 0.3 M foram adicionados para interromper as reações, as quais foram quantificadas em espectrofotômetro com filtro de 450 nm (SPECTRAmax 340PC®, EUA). Para a interpretação dos dados, os valores da densidade óptica (DO) média das duplicatas foram calculados, bem como os seus respectivos desvios padrão, utilizando o programa Microsoft Excel 2016.

4.9 EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO

O principal critério estabelecido para determinar as condições ótimas na padronização foi a eficiência do ensaio, prezando a distância de sinal entre o *pool* de amostras positivas e negativas. Para esta finalidade, estabelecemos que a média das DOs dos *pools* positivos deveria apresentar o sinal superior a 0,80 e dos negativos abaixo de 0,15, independente da molécula utilizada. Foi também levada em consideração a maior diferença entre as DOs médias dos *pools* positivos e as médias dos *pools* negativos, acrescidos de três desvios-padrão, segundo a fórmula:

$$(\bar{X} POS) - (\bar{X} NEG + 3DP)$$

Os dados de DO foram exportados para o *software* GraphPad Prism 7 para Windows v. 7.01 (GraphPad Software Inc., Chicago-IL, EUA) e os valores de *cut-off* (CO) definidos individualmente para cada microplaca, a partir da análise das curvas ROC geradas. As áreas abaixo da curva ROC (AUC) foram calculadas utilizando o intervalo de confiança de 95% (IC95%).

4.10 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO

4.10.1 Estudo de fase I

Para determinar o potencial diagnóstico dos antígenos IBMP para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* através do IBMP-DAS-ELISA, foram utilizadas as condições ótimas dos antígenos, amostras séricas e antígenos conjugados selecionados na padronização. Os imunoenaios foram realizados conforme no item 4.8. Nesta etapa, foi utilizado um painel sorológico previamente caracterizado, respeitando os critérios de inclusão e exclusão de amostras.

4.10.2 Análise em série e em paralelo

Para elevar o desempenho diagnóstico e diminuir a possibilidade de ocorrência de resultados indesejados, é possível realizar a combinação de diferentes testes. Assim, foram realizadas análises em série e em paralelo, através da combinação dos resultados do IBMP-DAS-ELISA.

Na análise em série, os dois testes precisam apresentar resultados positivos para que o indivíduo seja considerado positivo, podendo assim aumentar a especificidade do diagnóstico. Já a análise em paralelo, requer que apenas um dos testes apresente resultado positivo para que o indivíduo seja considerado positivo, aumentando a sensibilidade e por consequência podendo diminuir a especificidade do diagnóstico (CEBUL; HERSHEY; WILLIAMS, 1982; CHU, 1999; MEDRONHO *et al.*, 2009).

4.10.3 Estudo da reatividade cruzada

Foi realizada a avaliação da reatividade cruzada para outras doenças infecto-parasitárias de interesse em saúde pública empregando amostras séricas positivas para hepatite B (HBV, ou antígeno de superfície do vírus da hepatite B e HBC, ou antígeno do core do vírus da hepatite B), hepatite C, HIV (vírus da imunodeficiência humana), HTLV (vírus linfotrópico de células T humanas), sífilis e leishmaniose visceral. As reações foram conduzidas conforme descrito anteriormente. O diagnóstico sorológico para estas infecções foi realizado pelas Instituições parceiras. Todavia, o seu perfil sorológico para a DC foi avaliado utilizando os ensaios de ELISA indireto usando as quatro proteínas recombinantes quiméricas (resultados disponíveis no Anexo 1).

4.11 INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

4.11.1 Normalização dos dados, definição do ponto de corte e da área abaixo da curva

Este processo teve a finalidade de uniformizar os resultados, corrigindo a variabilidade entre os valores de DO obtidos em cada microplaca. Assim, foi calculado um índice de reatividade para cada amostra, através da seguinte fórmula:

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

Semelhante ao descrito no tópico 4.9, o cálculo do *cut-off* foi realizado no *software* GraphPad Prism 7 para Windows v. 7.01 (GraphPad Software Inc., Chicago-IL, EUA) e seu valor foi definido a partir da análise da curva ROC. As áreas abaixo da curva (AUC) foram determinadas considerando um intervalo de confiança de 95%, para avaliar a precisão para cada antígeno IBMP, que pode ser classificada de acordo com o quadro 2.

Valor	Classificação
1	Excelente
0,99-0,82	Elevado
0,81-0,62	Moderado
0,61-0,51	Baixo

Quadro 2 - Classificação do valor da área abaixo da curva ROC.

Fonte: Swets (1988).

Os resultados de CO foram exportados para o Microsoft Excel 2016, em que obtivemos o resultado de IR através da fórmula citada anteriormente. As amostras que apresentaram IR inferior a 1,00 foram consideradas negativas, e aquelas que apresentaram IR igual ou superior a 1,00 foram consideradas positivas. As amostras que apresentaram IR entre 0,9 e 1,1 (IR = 1,0 ± 10%), foram consideradas na zona cinza. A fim de corrigir possíveis erros inerentes à pipetagem, foi adotado como critério de repetição amostras previamente caracterizadas como positivas que apresentassem DO inferior a 1,20 e negativas superior a 0,80.

4.11.2 Cálculo do índice de *Kappa* de Cohen

A avaliação qualitativa do grau de concordância entre o IBMP-DAS-ELISA e os testes de referência foi realizada através da determinação do índice de *Kappa* de Cohen (κ), o qual mede o grau de concordância entre medidas da mesma variável categórica que não acontece ao acaso. Esta medida tem como valor máximo 1,00 que representa concordância total entre as avaliações e valor mínimo zero, indicando ausência de concordância entre as avaliações. A interpretação do índice κ foi realizada de acordo com o Quadro 3 (LANDIS; KOCH, 1977).

Valor (κ)	Classificação
$\kappa = 1$	Concordância perfeita
$0,99 \leq \kappa \leq 0,81$	Concordância quase perfeita
$0,80 \leq \kappa \leq 0,61$	Concordância substancial
$0,60 \leq \kappa \leq 0,41$	Concordância moderada
$0,40 \leq \kappa \leq 0,21$	Concordância justa
$0,20 \leq \kappa \leq 0,1$	Concordância leve
$\kappa = 0$	Concordância fraca

Quadro 3 - Classificação do índice de *Kappa* (κ).

Fonte: Landis; Koch (1977).

4.11.3 Avaliação dos parâmetros de desempenho

Os parâmetros de desempenho avaliados neste estudo de fase I foram área abaixo da curva, sensibilidade, especificidade, acurácia, proporção de falso-negativos, proporção de falso-positivos, índice de Youden e *Kappa* de Cohen, com seus respectivos intervalos de confiança. Para calcular e interpretar estas variáveis, foram utilizadas tabelas de dupla entrada (Figura 13), comparando os dados obtidos no IBMP-DAS-ELISA com os dados obtidos pelo teste referência (análise de classe latente utilizando os antígenos IBMP no ELISA indireto).

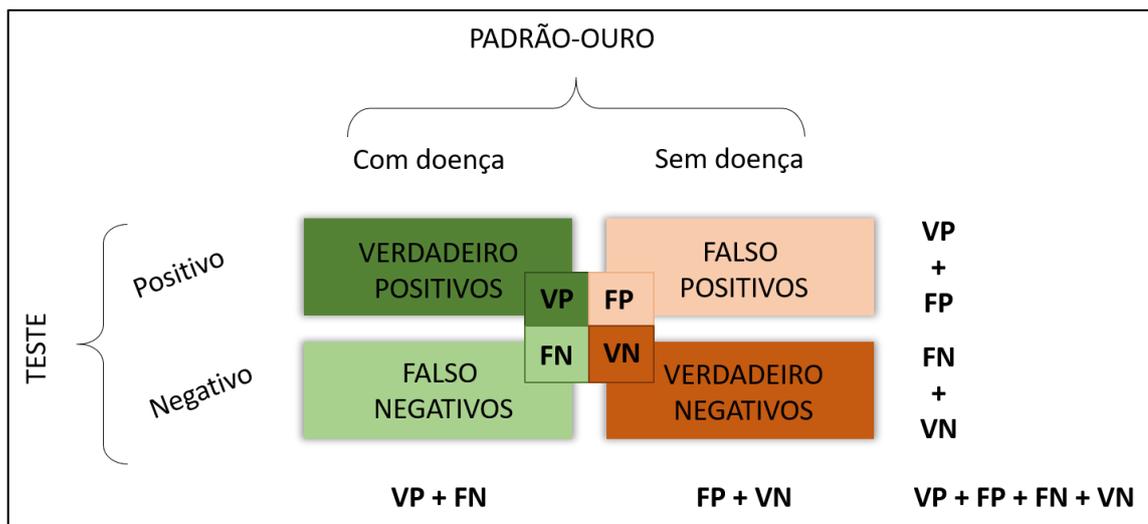


Figura 13 - Possíveis combinações entre resultados obtidos em um teste diagnóstico e o verdadeiro status da doença.

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

Fonte: Adaptado de Santos (2016).

4.11.4 Análise estatística

As variáveis mensuradas foram expressas em média aritmética, média geométrica e desvio padrão. Apenas na padronização dos imunoenaios, foram avaliadas as médias aritméticas das DOs, e nas demais análises, as médias geométricas, com seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC95%). A normalidade dos dados foi testada aplicando o teste de Shapiro-Wilk, e quando houve rejeição da hipótese nula, ou seja, quando a distribuição não foi normal, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Quando houve confirmação da normalidade dos dados, o teste T de Student foi aplicado. Todos os resultados foram avaliados levando em consideração o nível de significância de p ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 SDS-PAGE PARA ANÁLISE DA INTEGRIDADE DOS ANTÍGENOS IBMP

Após a chegada dos antígenos recombinantes quiméricos no LASP, foi realizada uma análise eletroforética para avaliar sua qualidade e integridade. Através desta análise, foram observadas a presença de bandas distintas de proteínas, ausência de contaminantes e pesos moleculares esperados para cada antígeno IBMP (Figura 14).

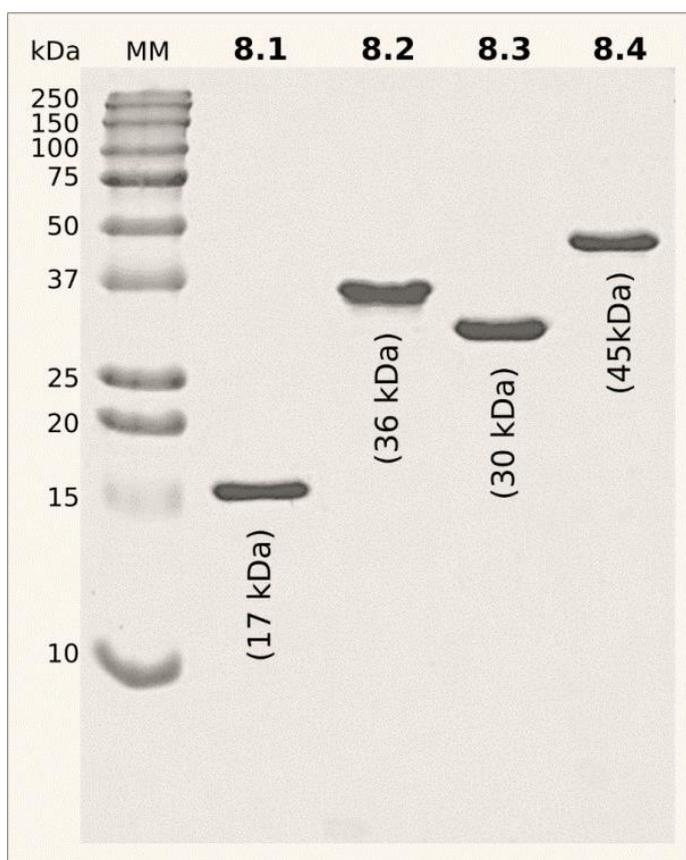


Figura 14 - SDS-PAGE dos antígenos IBMP.

Legenda: MM (massa molecular); kDa (quilodaltons).

Fonte: A autora.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO

Das 311 amostras positivas cedidas pelo LACEN-BA, 207 foram elegíveis para compor o estudo de fase I, quinze foram utilizadas para a preparação de *pools* séricos, três apresentaram volumes insuficientes e 86 amostras revelaram resultados discordantes entre os ensaios de recharacterização sorológica conduzidos no LASP através do IBMP-ELISA indireto (SANTOS *et al.*, 2016b; SANTOS *et al.*, 2017a) e, por este motivo foram descartadas do estudo (Figura 15).

Para o painel de amostras negativas, foram utilizadas 205 amostras do HEMOBA, com resultados de IBMP-ELISA indireto conhecidos e obtidos anteriormente pelo nosso grupo (SANTOS, 2020).

Para avaliação da reatividade cruzada, foram selecionadas 68 amostras de outros agravos, previamente caracterizadas pelas Instituições parceiras, porém negativas para *T. cruzi*, sendo elas: hepatite B (n = 10 para HBV e n = 10 para HBC), hepatite C (10 amostras), HIV (n = 9), HTLV (n = 9), sífilis (n = 10) e leishmaniose visceral (n = 10).

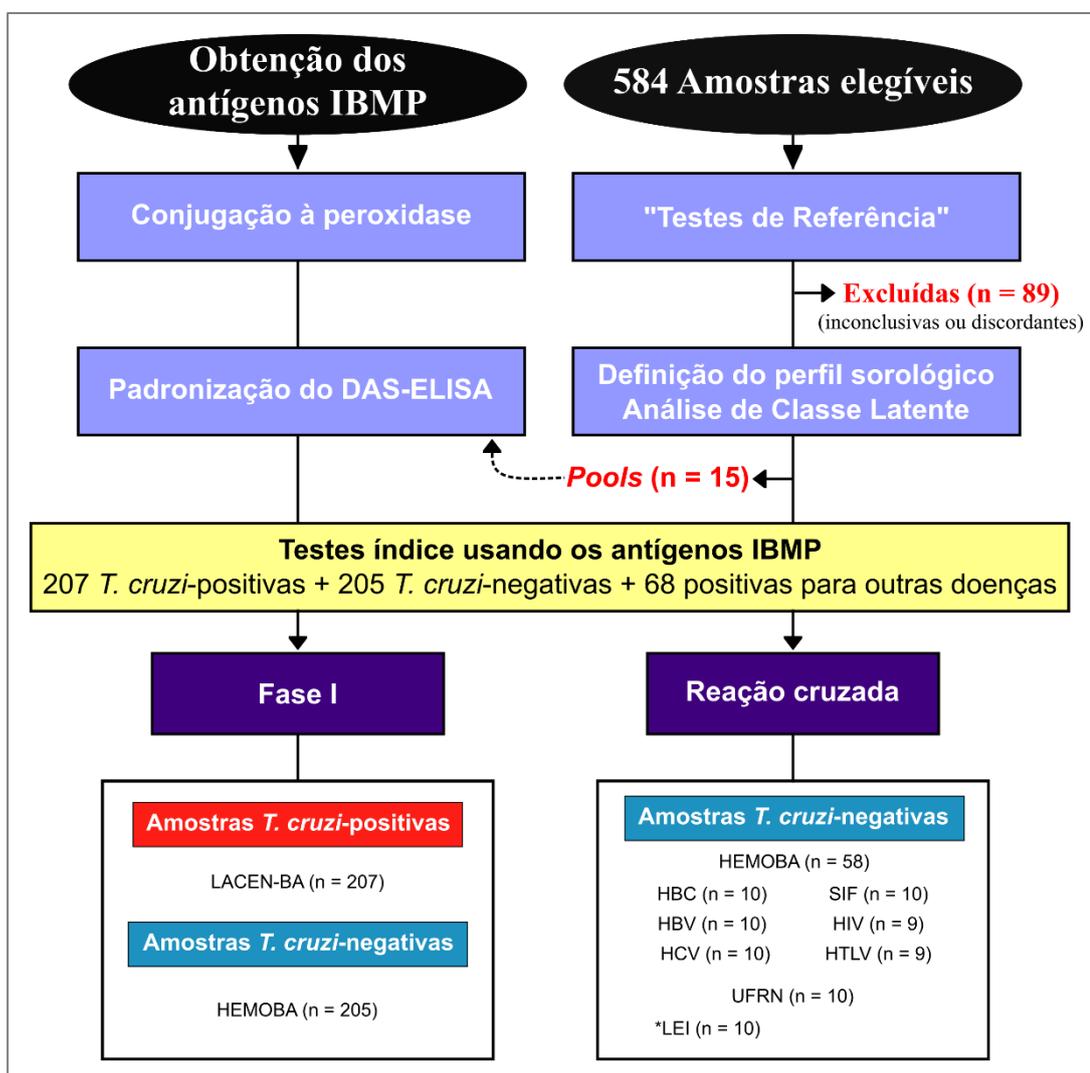


Figura 15 - Fluxograma representando o desenho do estudo para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* em amostras humanas através do DAS-ELISA.

Nota: *Avaliadas somente nos testes índices que usaram IBMP-8.1 e IBMP-8.4 como preparação antigênica.

Fonte: A autora.

5.3 PADRONIZAÇÃO DO IBMP-DAS-ELISA

A massa de antígeno e diluições do soro e antígeno conjugado foram avaliadas através de uma matriz de decisão (*checkerboard titration*). As melhores condições foram selecionadas considerando os critérios anteriormente descritos, ou seja, levando em consideração a distância entre a DO média dos *pools* positivos e negativos e aquelas em que o sinal dos *pools* de amostras positivas fosse superior a 0,80 e os *pools* de negativas, um sinal inferior a 0,15.

O primeiro antígeno a ser padronizado foi o IBMP-8.4, por ter apresentado o melhor desempenho nos estudos realizados anteriormente (DEL-REI *et al.*, 2019; DOPICO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2017a; SANTOS *et al.*, 2017b). As condições de massa de antígeno por cavidade inicialmente avaliadas foram 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 ng, enquanto as diluições do antígeno conjugado variaram de 1:500; 1:1.000; 1:5.000 e 1:10.000. Para este experimento não houve diluição das amostras biológicas. Até o momento de realização destes ensaios, o grupo não tinha conhecimento das condições de funcionamento do antígeno conjugado à peroxidase. Desta forma, esta etapa foi considerada preliminar, e nenhuma das condições avaliadas foi considerada satisfatória (Figura 16), visto que as DOs das amostras positivas permaneceram abaixo de 0,80.

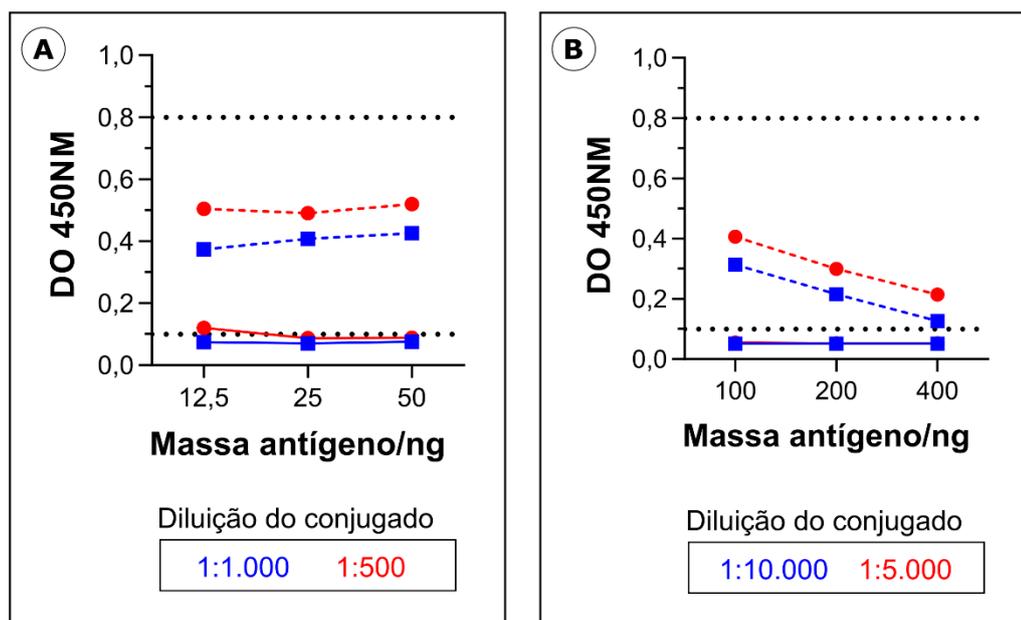


Figura 16 - Análise gráfica dos valores médios de densidade óptica do antígeno IBMP-8.4 na padronização preliminar.

Nota: Análise gráfica dos valores médios de densidade óptica do antígeno IBMP-8.4, sem diluição do soro. Diluição do conjugado de 500; 1.000; 2.000; 5.000 e 10.000 vezes, com 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 ng do antígeno, sem diluição sérica. As linhas pretas tracejadas inferiores representam o limite máximo requerido para o conjunto de amostras negativas (0,15), enquanto as superiores representam o limite mínimo desejável de densidade óptica para as amostras positivas (0,80). As linhas vermelhas tracejadas simbolizadas com círculos “●” correspondem as diluições de 1:500 (A) ou 1:5.000 (B) do antígeno conjugado, enquanto as linhas azuis tracejadas simbolizados com quadrados “■” correspondem às diluições 1:1.000 (A) ou 1.10.000 (B). As linhas vermelhas e azuis contínuas representam os sinais das amostras negativas, e as linhas vermelhas e azuis tracejadas representam as amostras positivas.

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

Fonte: A autora.

Ao avaliar o comportamento do antígeno IBMP-8.4, a padronização foi reestruturada para as quantidades de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 ng de antígeno por cavidade, enquanto as diluições de antígeno conjugado variaram de 1:1.000 e 1:2.000. Neste caso, as amostras séricas foram avaliadas na diluição de 1:2 (Figura 17A) ou sem diluição (Figura 17B).

Assim, as condições consideradas satisfatórias foram encontradas com 25 ng de antígeno, diluição do conjugado de 1:2.000 e amostras séricas sem diluição, por apresentar uma alta variação de sinal entre amostras positivas e negativas e maior economia de antígeno e conjugado (Figura 17; Tabela 1).

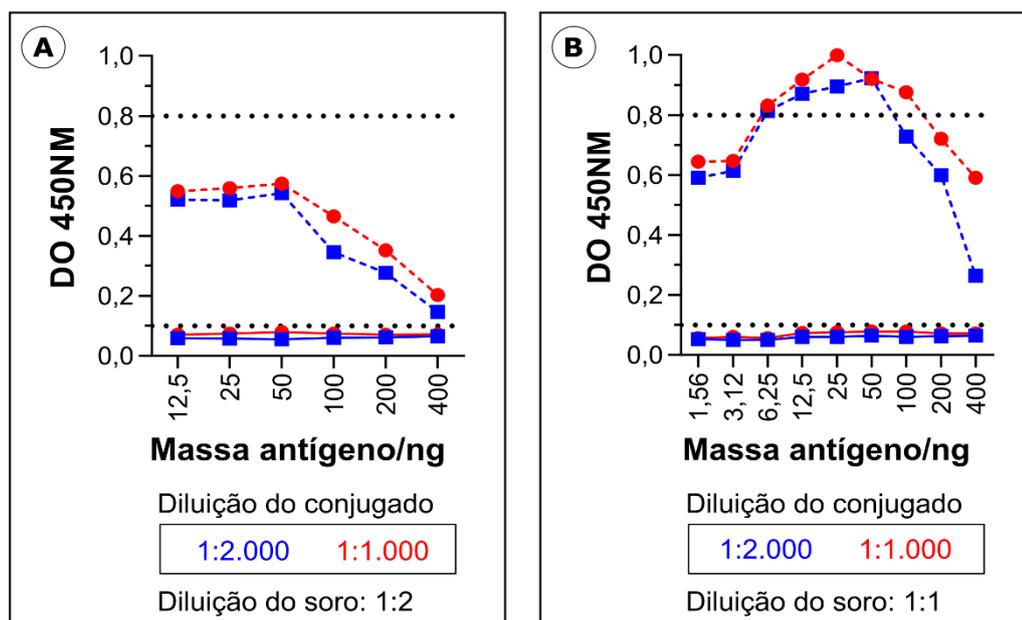


Figura 17 - Análise gráfica dos valores médios de densidade óptica do antígeno IBMP-8.4.

Nota: Valores médios de densidade óptica do antígeno IBMP-8.4, sem variação da diluição sérica (B) ou com diluição 1:2 (A), a diluição do conjugado de 1.000 e 2.000 vezes, com 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 ng do antígeno. As linhas pretas tracejadas inferiores representam o limite máximo requerido para o conjunto de amostras negativas (0,15), enquanto as superiores representam o limite mínimo desejável de densidade óptica para as amostras positivas (0,80). As linhas vermelhas tracejadas simbolizadas com círculos “●” correspondem a diluição de 1:1.000 do antígeno conjugado, enquanto as linhas azuis tracejadas simbolizados com quadrados “■” correspondem à diluição 1:2.000. As linhas vermelhas e azuis contínuas representam os sinais das amostras negativas, e as linhas vermelhas e azuis tracejadas representam as amostras positivas.

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

Fonte: A autora.

A partir destes resultados foi possível observar que a diluição das amostras séricas em PBS não se adequaria aos critérios de aceitação estabelecidos para o ensaio e, por este motivo, esta condição não foi avaliada na padronização das demais moléculas. Portanto, foram avaliadas as quantidades de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 ng de antígeno por cavidade e conjugado nas diluições de 1:1.000 e 1:2.000, na ausência de diluição sérica.

Para os antígenos IBMP-8.1 (Figura 18A Tabela 2), IBMP-8.2 (Figura 18B; Tabela 3) e IBMP-8.3 (Figura 18C; Tabela 4), as condições selecionadas foram 25 ng de antígeno por poço e diluição do conjugado de 1:2.000, na ausência de diluição sérica. Assim, os critérios preestabelecidos pelo grupo seriam cumpridos e a condição do ensaio seria semelhante ao ensaio com o antígeno IBMP-8.4.

Tabela 1: Análise da densidade óptica média dos *pools* utilizados na padronização do antígeno IBMP-8.4.

<i>Conjugado</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Soro</i>	$\bar{X} NEG$	<i>DP</i>	$\bar{X} NEG+3DP$	$\bar{X} POS$	$(\bar{X} POS) - (\bar{X} NEG+3DP)$	
<i>1:1.000</i>	400 ng	1:1	0,072	0,006	0,09	0,591	0,501	
		1:2	0,072	0,003	0,082	0,203	0,122	
	200 ng	1:1	0,072	0,004	0,085	0,721	0,635	
		1:2	0,071	0,006	0,09	0,352	0,261	
	100 ng	1:1	0,078	0,007	0,099	0,876	0,778	
		1:2	0,075	0,005	0,09	0,465	0,375	
	50 ng	1:1	0,078	0,007	0,1	0,92	0,82	
		1:2	0,079	0,01	0,11	0,574	0,464	
	25 ng	1:1	0,076	0,012	0,112	0,999	0,887	
		1:2	0,075	0,009	0,102	0,559	0,457	
	12,5 ng	1:1	0,073	0,004	0,084	0,918	0,834	
		1:2	0,07	0,006	0,089	0,549	0,46	
	6,25 ng	1:1	0,057	0,006	0,075	0,831	0,756	
		1:2			Não realizado			
	3,125 ng	1:1	0,061	0,009	0,089	0,647	0,558	
		1:2			Não realizado			
	1,56 ng	1:1	0,056	0,006	0,074	0,644	0,57	
		1:2			Não realizado			
	<i>*1:2.000</i>	400 ng	1:1	0,064	0,006	0,082	0,264	0,182
			1:2	0,066	0,01	0,097	0,147	0,049
200 ng		1:1	0,063	0,005	0,077	0,6	0,522	
		1:2	0,062	0,008	0,085	0,277	0,192	
100 ng		1:1	0,06	0,004	0,074	0,729	0,655	
		1:2	0,061	0,005	0,077	0,346	0,269	
50 ng		1:1	0,064	0,006	0,081	0,923	0,843	
		1:2	0,055	0,003	0,066	0,542	0,477	
25 ng		1:1	0,061	0,008	0,084	0,895	0,811	
		1:2	0,058	0,003	0,067	0,519	0,452	
12,5 ng		1:1	0,061	0,007	0,082	0,871	0,789	

	1:2	0,059	0,002	0,066	0,521	0,455
6,25 ng	1:1	0,05	0,002	0,057	0,814	0,756
	1:2			Não realizado		
3,125 ng	1:1	0,05	0,003	0,059	0,614	0,555
	1:2			-		
1,56 ng	1:1	0,053	0,002	0,06	0,591	0,531
	1:2			Não realizado		

Nota: O texto em negrito representa as condições selecionadas para a realização dos imunoensaios.

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

Fonte: A autora.

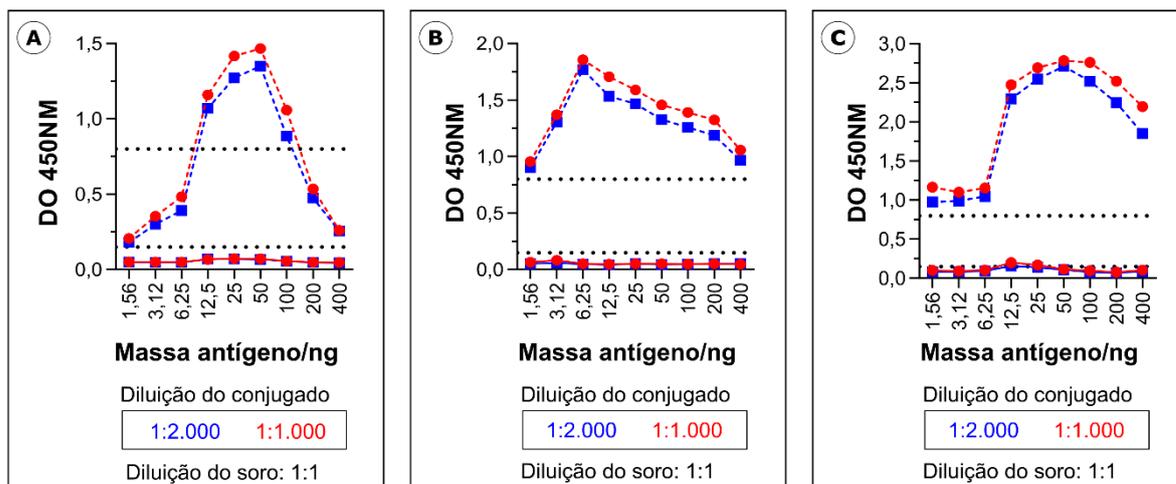


Figura 18 - Análise gráfica dos valores médios de densidade óptica do antígeno IBMP-8.1 (A), IBMP-8.2 (B) e IBMP-8.3 (C).

Nota: Valores médios de densidade óptica dos antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2 e IBMP-8.3 sem variação da diluição sérica, a diluição do conjugado de 1.000 e 2.000 vezes, com 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 ng do antígeno. As linhas pretas tracejadas inferiores representam o limite máximo requerido para o conjunto de amostras negativas (0,15), enquanto as superiores representam o limite mínimo desejável de densidade óptica para as amostras positivas (0,80). As linhas vermelhas tracejadas simbolizadas com círculos “●” correspondem a diluição de 1:1.000 do antígeno conjugado, enquanto as linhas azuis tracejadas simbolizados com quadrados “■” correspondem à diluição 1:2.000. As linhas vermelhas e azuis contínuas representam os sinais das amostras negativas, e as linhas vermelhas e azuis tracejadas representam as amostras positivas.

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

Fonte: A autora.

Tabela 2: Análise da densidade óptica média dos *pools* utilizados na padronização do antígeno IBMP-8.1.

<i>Conjugado</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Soro</i>	\bar{X} <i>NEG</i>	<i>DP</i>	\bar{X} <i>NEG+3DP</i>	\bar{X} <i>POS</i>	$(\bar{X} \text{ POS}) -$ $(\bar{X} \text{ NEG} + 3DP)$
<i>1:1.000</i>	400 ng	1:1	0,046	0,002	0,050	0,260	0,209
	200 ng	1:1	0,049	0,002	0,054	0,536	0,482
	100 ng	1:1	0,056	0,018	0,111	1,059	0,948
	50 ng	1:1	0,071	0,042	0,198	1,467	1,269
	25 ng	1:1	0,073	0,046	0,211	1,417	1,206
	12,5 ng	1:1	0,068	0,031	0,160	1,160	1,000
	6,25 ng	1:1	0,050	0,001	0,054	0,483	0,430
	3,125 ng	1:1	0,051	0,001	0,054	0,354	0,300
	1,56 ng	1:1	0,050	0,001	0,052	0,208	0,156
<i>*1:2.000</i>	400 ng	1:1	0,044	0,001	0,046	0,255	0,209
	200 ng	1:1	0,046	0,002	0,053	0,474	0,421
	100 ng	1:1	0,057	0,013	0,097	0,887	0,790
	50 ng	1:1	0,067	0,041	0,189	1,350	1,161
	25 ng	1:1	0,070	0,043	0,198	1,272	1,074
	12,5 ng	1:1	0,028	0,028	0,113	1,069	0,956
	6,25 ng	1:1	0,047	0,002	0,054	0,393	0,339
	3,125 ng	1:1	0,047	0,000	0,048	0,301	0,253
	1,56 ng	1:1	0,050	0,004	0,061	0,181	0,121

Nota: O texto em negrito representa as condições selecionadas para a realização dos imunoenaios.

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

Fonte: A autora.

Tabela 3: Análise da densidade óptica média dos *pools* utilizados na padronização do antígeno IBMP-8.2.

<i>Conjugado</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Soro</i>	$\bar{X} NEG$	<i>DP</i>	$\bar{X} NEG+3DP$	$\bar{X} POS$	$(\bar{X} POS) - (\bar{X} NEG+3DP)$
<i>1:1.000</i>	400 ng	01:01	0,048	0,002	0,054	1,056	1,001
	200 ng	01:01	0,053	0,008	0,077	1,324	1,247
	100 ng	01:01	0,050	0,002	0,055	1,585	1,530
	50 ng	01:01	0,053	0,014	0,097	1,458	1,361
	25 ng	01:01	0,052	0,006	0,071	1,589	1,518
	12,5 ng	01:01	0,047	0,002	0,053	1,707	1,654
	6,25 ng	01:01	0,051	0,007	0,072	1,855	1,782
	3,125 ng	01:01	0,083	0,055	0,246	1,369	1,123
	1,56 ng	01:01	0,066	0,020	0,127	0,955	0,828
<i>* 1:2.000</i>	400 ng	01:01	0,053	0,001	0,055	0,967	0,912
	200 ng	01:01	0,053	0,005	0,067	1,188	1,121
	100 ng	01:01	0,047	0,002	0,052	1,431	1,379
	50 ng	01:01	0,045	0,002	0,049	1,327	1,278
	25 ng	1:1	0,051	0,006	0,068	1,468	1,400
	12,5 ng	01:01	0,002	0,002	0,009	1,533	1,525
	6,25 ng	01:01	0,049	0,002	0,056	1,770	1,714
	3,125 ng	01:01	0,057	0,014	0,100	1,306	1,206
	1,56 ng	01:01	0,051	0,003	0,060	0,903	0,842

Nota: O texto em negrito representa as condições selecionadas para a realização dos imunoensaios.

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

Fonte: A autora.

Tabela 4: Análise da densidade óptica média dos *pools* utilizados na padronização do antígeno IBMP-8.3.

<i>Conjugado</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Soro</i>	\bar{X}_{NEG}	<i>DP</i>	$\bar{X}_{NEG+3DP}$	\bar{X}_{POS}	$(\bar{X}_{POS}) - (\bar{X}_{NEG+3DP})$
<i>1:1.000</i>	400 ng	1:1	0,105	0,016	0,153	2,196	2,043
	200 ng	1:1	0,079	0,006	0,096	2,522	2,426
	100 ng	1:1	0,098	0,019	0,156	2,762	2,606
	50 ng	1:1	0,117	0,062	0,302	2,785	2,483
	25 ng	1:1	0,171	0,098	0,466	2,691	2,226
	12,5 ng	1:1	0,201	0,085	0,455	2,476	2,021
	6,25 ng	1:1	0,104	0,040	0,223	1,155	0,932
	3,125 ng	1:1	0,094	0,018	0,148	1,103	0,955
	1,56 ng	1:1	0,102	0,028	0,187	1,167	0,979
<i>*1:2.000</i>	400 ng	1:1	0,087	0,004	0,100	1,852	1,751
	200 ng	1:1	0,072	0,006	0,090	2,247	2,157
	100 ng	1:1	0,080	0,029	0,166	2,522	2,356
	50 ng	1:1	0,107	0,049	0,253	2,711	2,458
	25 ng	1:1	0,140	0,089	0,408	2,546	2,138
	12,5 ng	1:1	0,080	0,080	0,319	2,294	1,975
	6,25 ng	1:1	0,094	0,030	0,185	1,046	0,861
	3,125 ng	1:1	0,083	0,025	0,158	0,992	0,834
1,56 ng	1:1	0,081	0,024	0,154	0,976	0,822	

Nota: O texto em negrito representa as condições selecionadas para a realização dos imunoenaios.

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

Fonte: A autora.

5.4 ESTUDO DE FASE I

Levando em consideração a área abaixo da curva ROC (AUC), o antígeno que apresentou maior capacidade discriminatória entre amostras positivas e negativas foi o IBMP-8.2 (AUC = 99,5%), seguido pelo IBMP-8.4 (AUC = 98,8%), IBMP-8.1 (AUC = 98,7%) e IBMP-8.3 (AUC = 98,58%), respectivamente (Figura 19). Segundo a classificação dos valores de AUC apresentados no Quadro 2, todos os antígenos IBMP obtiveram valores excelentes. Considerando

a sobreposição dos valores de IC95%, não houve diferença entre eles. Todos os antígenos diferenciaram as amostras positivas das negativas de forma significativa ($p < 0,0001$; Figura 19)

Do total de amostras positivas, o antígeno IBMP-8.1 classificou 53 (25,6%) como falso-negativas, o IBMP-8.2, 27 (13%), o IBMP-8.3, 24 (11,6%) e o IBMP-8.4, 43 (20,8%), conferindo sensibilidades de 74,4%, 87,0%, 88,4% e 79,2%, respectivamente (Figura 19). Quanto aos valores de especificidade, o único antígeno que não atingiu 100% foi o IBMP-8.3, com um valor de 96,6%, por conta de 7 amostras falso-positivas (3,4% do total de amostras negativas), sendo uma delas localizada na zona cinza. O IBMP-8.4 apresentou o maior número de amostras na zona cinza ($n = 25$; 6,1%), seguindo pelo IBMP-8.1 ($n = 16$; 3,9%), IBMP-8.3 ($n = 8$; 1,9%) e IBMP-8.2 ($n = 4$; 1,0%) (Figura 19).

Na análise do índice de Youden (J), todos os antígenos IBMP apresentam capacidade discriminatória acima de 70%, com destaque para as moléculas IBMP-8.2 e IBMP-8.3, com valores superiores a 80% (Figura 19). Quanto ao índice de *Kappa* de Cohen (κ), os antígenos IBMP-8.2 e IBMP-8.3 apresentaram graus de concordância quase perfeita (0,87 e 0,81, respectivamente) e IBMP-8.1 e IBMP-8.4 apresentaram graus de concordância substancial (0,74 e 0,79, respectivamente).

Dentre as amostras positivas, o antígeno que apresentou a maior média geométrica foi o IBMP-8.3 ($IR = 2,11 \pm 0,17$), seguido pelo IBMP-8.1 ($IR = 1,96 \pm 0,27$), IBMP-8.4 ($IR = 1,92 \pm 0,20$) e IBMP-8.2 ($IR = 1,64 \pm 0,20$) (Figura 19). Para as amostras negativas, o IBMP-8.2 ($IR = 0,07 \pm 0,002$) apresentou o menor sinal de reatividade, seguido pelo IBMP-8.3 ($IR = 0,13 \pm 0,002$), IBMP-8.4 ($IR = 0,20 \pm 0,010$) e IBMP-8.1 ($IR = 0,29 \pm 0,007$).

Considerando a sobreposição dos intervalos de confiança a 95% (IC95%) para o AUC (Figura 20), foi observado que não há diferença significativa entre os quatro antígenos quanto à sua capacidade diagnóstica. Comportamento semelhante foi observado para os valores de especificidade. Quanto à sensibilidade, foi observado que o IBMP-8.2 e o IBMP-8.3 identificam corretamente as amostras positivas com maior taxa de acerto quando comparados ao IBMP-8.1. Contudo, não foi observada diferença entre a molécula IBMP-8.4 e demais antígenos. Para a acurácia, o IBMP-8.2 mostrou-se superior ao IBMP-8.1; não havendo diferença entre as demais moléculas. Na avaliação do índice de *Kappa* de Cohen, observou-se que os resultados obtidos com o antígeno IBMP-8.2 apresentaram concordância superior com aqueles obtidos através da LCA (padrão-ouro) quando comparado ao IBMP-8.1 e ao IBMP-8.4 (Figura 20).

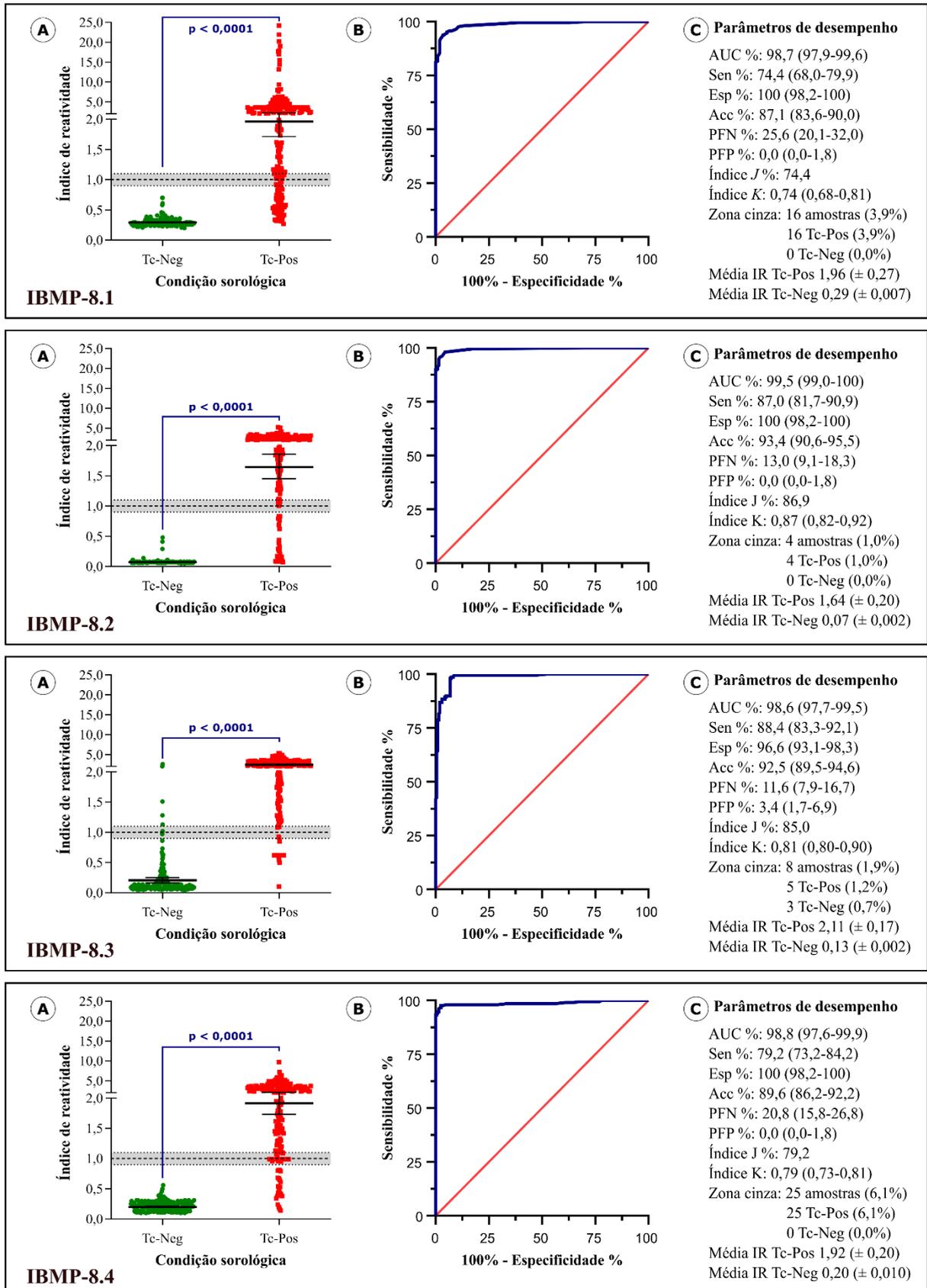


Figura 19 - Representação gráfica dos índices de reatividade dos antígenos IBMP no estudo de fase I (A), suas respectivas curvas ROC (B) e parâmetros de desempenho diagnóstico (C).

Nota: A área sombreada representa 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); PFN (Proporção de resultados falso-negativos); PFP (Proporção de resultados falso-positivos); J (Índice de Youden); k (Índice de Kappa de Cohen); IR (Índice de reatividade).

Fonte: A autora.

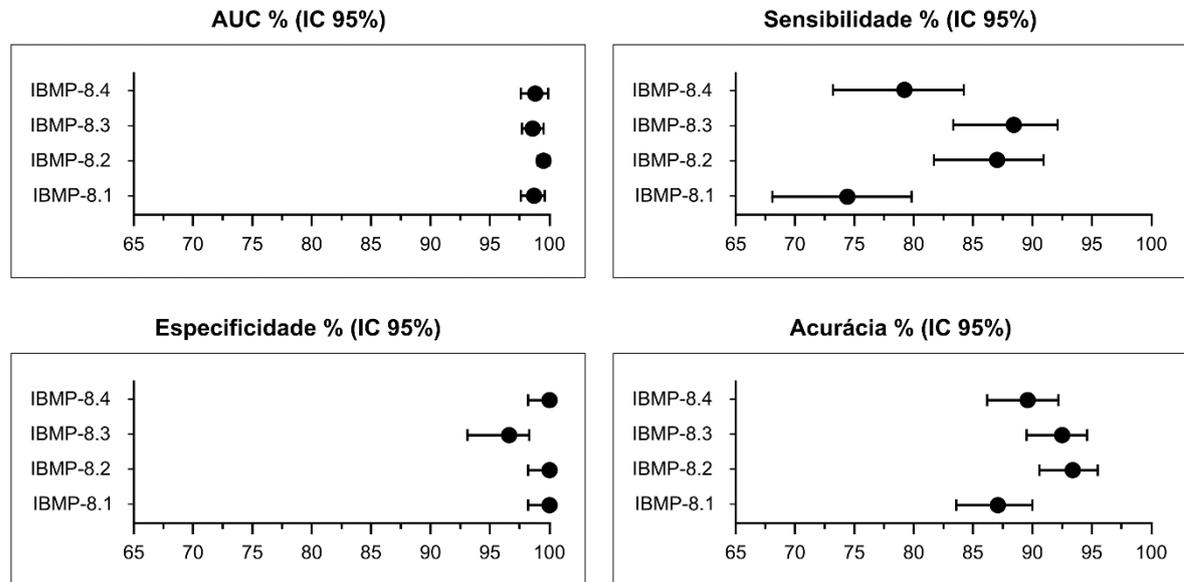


Figura 20 - Representação gráfica dos intervalos de confiança a 95% (IC95%) da AUC, sensibilidade, especificidade, acurácia e índice de Kappa de Cohen, determinados para os antígenos IBMP.

Fonte: A autora.

Além do desempenho individual de cada molécula, foi analisado o desempenho diagnóstico em série e em paralelo usando dois IBMP-DAS-ELISA (Tabela 5). De acordo com o esquema em série, a sensibilidade variou de 58,9% a 76,9%, enquanto a especificidade alcançou valores de 100%. Quanto à acurácia, os valores variaram de 79,4% para os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 a 88,4% para o IBMP-8.2 e IBMP-8.3. Por outro lado, os valores de sensibilidade variaram de 94,7% a 98,5% utilizando o esquema em paralelo. O valor máximo de sensibilidade foi alcançado através do uso combinado das moléculas IBMP-8.2 + IBMP-8.3. No entanto, devido à sobreposição dos valores de IC95%, não houve diferença significativa da sensibilidade para qualquer combinação usando o esquema em paralelo. Nenhum resultado falso-positivo foi obtido quando as amostras negativas foram testadas em paralelo com pares os IBMP-8.1/IBMP-8.2, IBMP-8.1/IBMP-8.4 e IBMP-8.2/IBMP-8.4. Considerando ainda o esquema em paralelo, foi observado que, independentemente do conjunto de antígenos usados, os valores de acurácia foram superiores a 96%, com valor máximo de 98,6% usando o par IBMP-8.2/IBMP-8.4. Todavia, dada a sobreposição dos IC95%, não houve diferença significativa entre os valores de acurácia.

Tabela 5: 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	64,7 (55,6-72,6)	100 (99,7-100)	82,3 (77,7-86,3)
IBMP-8.1 / IBMP-8.3	65,8 (56,6-73,6)	100 (99,9-100)	82,8 (78,2-86,7)
IBMP-8.1 / IBMP-8.4	58,9 (49,8-67,3)	100 (99,9-100)	79,4 (74,8-83,6)
IBMP-8.2 / IBMP-8.3	76,9 (68,1-83,7)	100 (99,9-100)	88,4 (83,9-91,8)
IBMP-8.2 / IBMP-8.4	68,9 (59,8-76,5)	100 (99,9-100)	84,4 (79,8-88,2)
IBMP-8.3 / IBMP-8.4	70,0 (61,0-77,6)	100 (99,9-100)	84,9 (80,3-88,7)
Paralelo	% (IC 95%)	% (IC 95%)	% (IC 95%)
IBMP-8.1 / IBMP-8.2	96,7 (94,1-98,2)	100 (96,4-100)	98,3 (95,3-99,1)
IBMP-8.1 / IBMP-8.3	97,0 (94,7-98,4)	96,6 (91,4-98,3)	96,8 (93,1-98,4)
IBMP-8.1 / IBMP-8.4	94,7 (91,4-96,8)	100 (96,4-100)	97,3 (93,9-98,4)
IBMP-8.2 / IBMP-8.3	98,5 (96,9-99,3)	96,6 (91,4-98,3)	97,5 (94,2-98,8)
IBMP-8.2 / IBMP-8.4	97,3 (95,1-98,6)	100 (96,4-100)	98,6 (95,8-99,3)
IBMP-8.3 / IBMP-8.4	97,6 (95,5-98,8)	96,6 (91,4-98,3)	97,1 (93,5-98,5)

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

Fonte: A autora.

5.5 ESTUDO DA REATIVIDADE CRUZADA

A avaliação gráfica das reações cruzadas está descrita na Figura 21. Do total de amostras analisadas, nenhuma apresentou sinal acima de 1,00, indicando ausência de reatividade cruzada. Para os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 foram avaliadas 10 amostras positivas para leishmaniose visceral. A análise de reatividade cruzada para este patógeno foi inviável para os antígenos IBMP-8.2 e IBMP-8.3 devido à indisponibilidade de material biológico. Os maiores índices de reatividade foram observados para o antígeno IBMP-8.1, contudo foram inferiores a 0,30. Para o IBMP-8.2, os sinais foram inferiores a 0,09, enquanto para o IBMP-8.3 e IBMP-8.4, os índices foram inferiores a 0,22. A média de sinal obtida para todos os antígenos,

independentemente do patógeno avaliado, foram semelhantes àqueles encontrados para as amostras negativas para a DC, conforme demonstrado na Figura 19. Somente a molécula IBMP-8.3 apresentou resultados na zona cinza: 1 amostra positiva para HBC (HEMOBA-105 com IR = 1,01), 1 para HBC (HEMOBA-183 com IR = 0,99) e duas amostras positivas para HTLV-1/2 (HEMOBA-147 com IR = 1,07 e HEMOBA-262 com IR = 0,92).

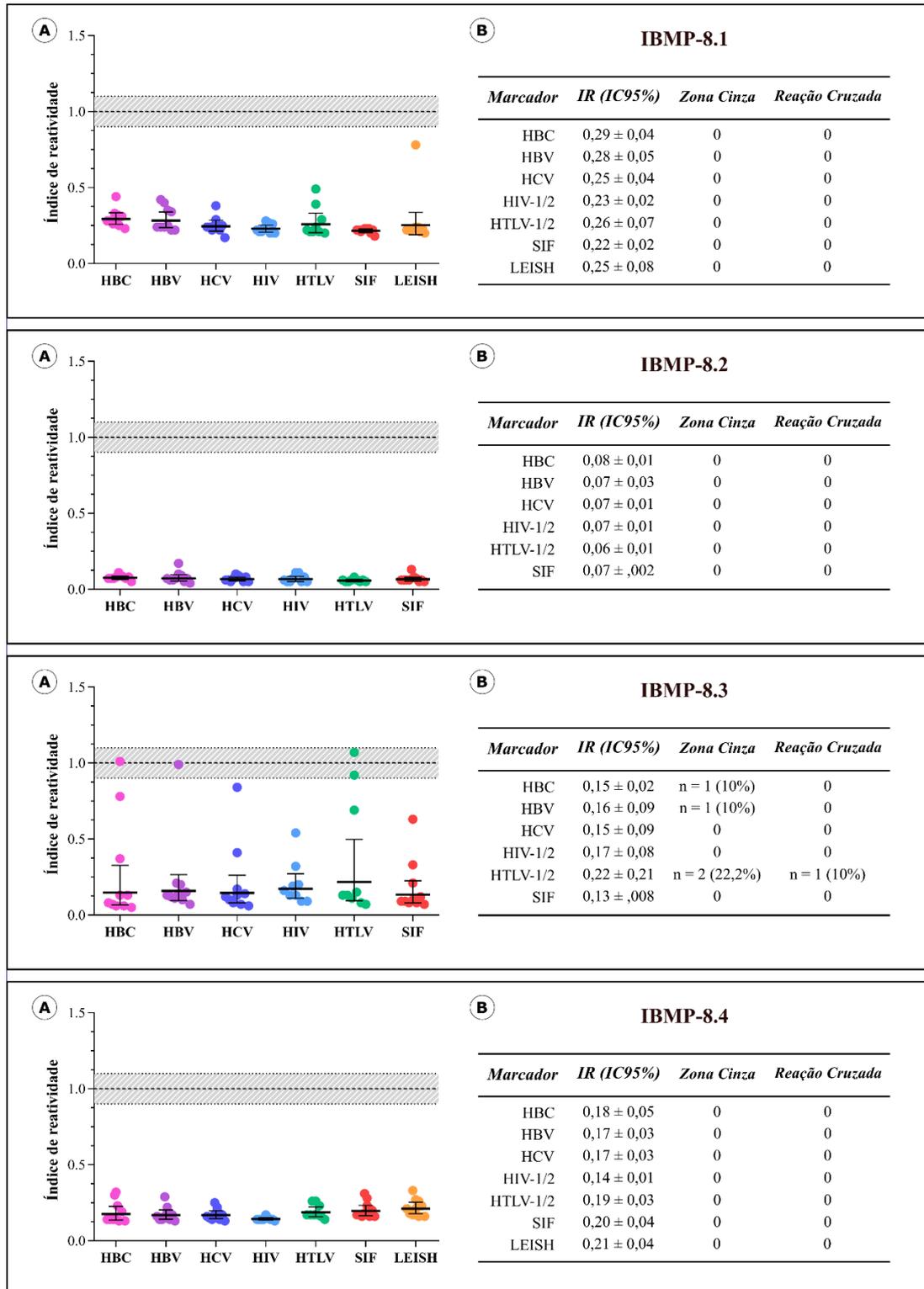


Figura 21 - Análise gráfica da reatividade cruzada dos antígenos IBMP com soros de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias.

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

Legenda: HBC (Antígeno do core do vírus da hepatite B); HBV (Antígeno de superfície do vírus da hepatite B); HCV (Vírus da hepatite C); HIV (Vírus da imunodeficiência humana); HTLV (Vírus linfotrófico de células T humanas); SIF (Sífilis); LEISH (Leishmaniose visceral).

Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

A doença de Chagas ainda é considerada um grande problema de Saúde Pública e se encontra no rol de doenças negligenciadas. Embora diversos avanços tenham sido alcançados nos últimos anos, o desenvolvimento de novas metodologias capazes de compor um ensaio padrão-ouro para a sua identificação ainda é necessário. Por conta desta lacuna, recomenda-se que sejam utilizados dois testes de metodologias distintas (WHO, 2002) ou metodologias semelhantes com preparações antigênicas distintas (DIAS *et al.*, 2016). Assim, o desenvolvimento de metodologias utilizando marcadores mais precisos é de suma importância. Tais metodologias devem ser sensíveis, de simples execução, acessíveis a populações vulneráveis e de baixo custo, pois irão auxiliar na tomada de decisões clínicas e em avaliações epidemiológicas do agravo em questão.

Um dos principais obstáculos no desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas para a DC é variabilidade genética e fenotípica do *T. cruzi*, o que dificulta a seleção de antígenos capazes de detectar anticorpos específicos em indivíduos infectados por diferentes cepas do parasito. Guzmán-Gómez e colaboradores (2015) detectaram um padrão de discordância entre três testes comerciais de ELISA e dois desenvolvidos *in-house*, os quais utilizaram extratos brutos da cepa LJ01 e do clone CL-Brener (cepa CL). Similarmente, um estudo realizado no ano de 2016 (SANTOS *et al.*, 2016a) avaliou o desempenho de quatro testes de ELISA com registro ativo na ANVISA para o diagnóstico da DC, sendo demonstrada variação do desempenho dos testes de acordo com as preparações antigênicas utilizadas. Desta forma, inexistente um teste comercial que possa ser utilizado universalmente com segurança para detectar anticorpos anti-*T. cruzi* nos portadores da doença, independentemente da localidade e da cepa infectante. Por este motivo, as quatro proteínas recombinantes quiméricas descritas nesta dissertação foram desenhadas, expressas e seu potencial antigênico extensivamente avaliado, sendo demonstrado que são capazes de detectar anticorpos anti-*T. cruzi* provenientes da infecção por diferentes cepas, mantendo altos valores de sensibilidade e especificidade (DEL-REI *et al.*, 2019; DOPICO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2017a) e baixos índices de reatividade cruzada com leishmaniose cutânea e visceral (DALTRO *et al.*, 2019).

No presente estudo, buscamos aprimorar o IBMP-ELISA através da técnica de duplo-antígeno, abrindo possibilidades para o diagnóstico da infecção aguda (através da detecção de anticorpos IgM) e da infecção crônica (através da detecção de anticorpos IgG), bem como a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* em diferentes espécies de mamíferos hospedeiros do *T. cruzi*. Outras plataformas diagnósticas também utilizam a tecnologia de duplo antígeno, como o ensaio

imunofluorimétrico de duplo-antígeno (DAS-TRIFMA) (WU *et al.*, 2008) e ensaios imunoenzimáticos de terceira geração para HIV com esferas (*beads*) de poliestireno (BÜRGISSER *et al.*, 1996). Em 2008, um estudo conduzido por Wu e colaboradores demonstrou que o método DAS-TRIFMA alcançou desempenho superior ao ser comparado a métodos indiretos para o diagnóstico do HCV. Dentre as vantagens elencadas, os autores chamaram atenção para a ausência de diluição das amostras séricas, possibilitando a identificação de indivíduos com baixos títulos de anticorpos circulantes. Um outro teste que utiliza a tecnologia duplo-antígeno é o Elecsys[®] Chagas (Roche Diagnostics, USA), um ensaio quimiluminescente automatizado para análise qualitativa de anticorpos anti-*T. cruzi* em soro humano. Para a sua realização, 18-30 µL de soro são incubados com uma mistura de antígenos marcados com biotina e antígenos marcados com rutênio, para formação dos imunocomplexos. Assim, espera-se que cada sítio de ligação do IgG se ligue a um dos antígenos marcados. Ao fim do processo, a reação é revelada através da reação de quimiluminescência emitida pelo rutênio. O desempenho diagnóstico desta metodologia foi comparado ao de testes comerciais disponíveis na Europa e América Latina, apresentando sensibilidade de 100% e especificidades de 99,9% para doadores de sangue e 100% para gestantes e de pacientes hospitalizados (FLORES-CHAVEZ *et al.*, 2018).

Assim, a ausência de um teste padrão-ouro e necessidade de metodologias precisas para o diagnóstico da infecção causada pelo *T. cruzi* nos motivaram a avaliar o desempenho das moléculas IBMP utilizando o ELISA sanduíche duplo-antígeno como plataforma diagnóstica. Além disso, esta metodologia poderá ser empregada na identificação da infecção em reservatórios mamíferos, sendo que para estes, inexistem metodologias comercialmente disponíveis no mercado mundial. A padronização dos imunoenaios e resultado dos estudos de fase I e de reatividade cruzada são discutidas abaixo.

6.1 PADRONIZAÇÃO DO IBMP-DAS-ELISA

Como observado em estudos anteriores, os antígenos IBMP apresentaram elevada capacidade de diferenciação entre indivíduos positivos e negativos para a DC (DEL-REI *et al.*, 2019; DOPICO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2016b, 2017a, 2017b). No presente estudo, após a realização do *checkboard titration*, foram selecionadas as condições de 25 ng de antígeno por cavidade da microplaca de titulação e diluição do antígeno conjugado à 1:2.000, na ausência de diluição sérica.

Em padronizações prévias do grupo, as quantidades de antígeno por poço variaram de 12,5 a 25 ng no ELISA indireto para humanos (SANTOS *et al.*, 2016b) e 25 a 50 ng para cães

(LEONY *et al.*, 2019). No DAS-ELISA, foi possível padronizar quantidades de antígeno iguais para todas as moléculas IBMP, sem interferir no desempenho do ensaio. Comparando nossos resultados com os disponíveis na literatura científica, foi observado que a quantidade de antígeno necessária para padronização dos imunoenaios foi significativamente menor. De fato, Umezawa e colaboradores (1999) utilizaram 6 µg de antígeno por cavidade ao avaliar antígenos recombinantes e extratos totais. Mais recentemente, Imai e colaboradores (2021) avaliaram diferentes testes de ELISA *in-house*, e utilizaram 1,0 µg de lisado do parasito e 50-100 ng de antígenos recombinantes por cavidade. Além disto, o IBMP-DAS-ELISA não necessitou de bloqueadores peptídicos no processo de sensibilização das placas, como leite desnatado por exemplo (UMEZAWA *et al.*, 1999). A sensibilização *overnight* também não foi necessária, por utilizarmos o WellChampion™ (Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca). Este reagente estabiliza, preserva e bloqueia os grupos reativos das cavidades, além de ser livre de BSA (albumina de soro bovino) e componentes tóxicos como azida e mercúrio.

Em ensaios indiretos para o diagnóstico da DC, a diluição sérica varia entre os protocolos disponíveis na literatura. No caso do IBMP-ELISA indireto, a diluição sérica foi padronizada em 1:100 (Santos *et al.*, 2016b). Usualmente, o DAS-ELISA não requer diluição (HE *et al.*, 2011; SARLI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2019), pois é necessária a maior quantidade de anticorpos possível para que ocorra a ligação com os antígenos da placa e os antígenos marcados solúveis. Apesar da necessidade de maior volume de soro, este fator pode se caracterizar como uma vantagem, pois há uma menor possibilidade da ocorrência de erros do operador na diluição das amostras. Para o IBMP-DAS-ELISA, as amostras séricas foram avaliadas na ausência de diluição e diluídas 1:2. Contudo, foi observado que o uso de amostras diluídas reduzia o sinal das amostras positivas, optando-se, portanto, pelo uso de amostras séricas sem diluição.

Foi também observado que, para que o ensaio seja eficiente, é necessária uma menor diluição dos antígenos conjugados, reflexo da menor oferta de sítios de ligação dos anticorpos primários. Diferente dos ensaios indiretos, em que a tendência é aumentar a diluição do conjugado a medida em que se diminui a diluição do soro, o DAS-ELISA requer maiores quantidades de ambos. Por este motivo, o antígeno conjugado à peroxidase foi padronizado à 1:2.000, diluição vinte vezes menor do que aquela utilizada no IBMP-ELISA indireto (1:40.000), porém semelhante a outros estudos envolvendo antígenos conjugados à HRP no formato ELISA, que variaram entre 1:800 (HU *et al.*, 2008), 1:2.000 (JIAO *et al.*, 2012), 1:4.000 (GE *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2009) e 1:5.000 (YANG *et al.*, 2006).

6.2 ESTUDO DE FASE I

O estudo de fase I é uma prova de conceito, e com objetivo avaliar se o teste proposto tem capacidade de distinguir amostras positivas das negativas para um determinado agravo. Para a realização deste estudo, foram utilizadas 205 amostras positivas e 207 negativas para a DC. Previamente à realização do estudo de fase I, o painel amostral foi recaracterizado através do IBMP-ELISA indireto utilizando os quatro antígenos quiméricos, seguido de uma análise de classe latente (LCA), conforme realizada anteriormente por Santos e colaboradores (2018).

No IBMP-DAS-ELISA, os quatro antígenos apresentaram valores de AUC superiores a 98,5%, revelando elevada capacidade diagnóstica. Todavia, foram inferiores àqueles reportados no IBMP-ELISA indireto, que variam de 99,14% a 99,55% (SANTOS *et al.*, 2016b). Apesar desta diferença, o desempenho diagnóstico dos antígenos IBMP no DAS-ELISA foi elevado, apresentando diferenças significantes do índice de reatividade médio entre o grupo de amostras positivas e negativas para a DC. Neste tipo de estudo, é necessário levar em consideração fatores inerentes à plataforma diagnóstica avaliada, que são a sensibilidade e a especificidade analíticas. A sensibilidade analítica, caracterizada pela habilidade do teste de detectar a menor concentração possível do analito (SAAH e HOOVER, 1997), pode ser menor no DAS-ELISA, em virtude da necessidade de uma maior quantidade de anticorpos disponíveis para serem detectados tanto pelos antígenos sensibilizados na fase sólida quanto pelos antígenos solúveis conjugados à peroxidase. Já a especificidade analítica, capacidade de identificar o analito de interesse, e não um similar (SAAH e HOOVER, 1997), pode ser maior, uma vez que há chances significativamente menores de ocorrerem ligações inespecíficas dos antígenos conjugados à peroxidase.

Diferente do observado por Santos e colaboradores (2016b), neste estudo, o IBMP-8.2 foi o que mais se destacou em valores de AUC e acurácia, atingindo 99,5% e 93,4%, respectivamente. Este antígeno diagnosticou corretamente todas as amostras negativas e classificou 27 amostras positivas erroneamente como falso-negativas. Já o IBMP-8.4, que no IBMP-ELISA indireto apresentou sensibilidade de 99,6%, teve seu valor reduzido para 79,2% no DAS-ELISA. O tamanho dessas moléculas pode ser uma possível explicação para este fato, visto que é o antígeno que apresenta maior quantidade de epítomos e, conseqüentemente, maior peso molecular, podendo ocorrer impedimento estereoquímico durante a formação dos imunocomplexos. No geral, a sensibilidade de todos os antígenos no IBMP-DAS-ELISA foi inferior àquela descrita pelo ELISA indireto (SANTOS *et al.*, 2017a), microarranjo líquido (SANTOS *et al.*, 2017b), imunocromatografia (SILVA *et al.*, 2020) e ressonância plasmônica de

superfície (CORDEIRO *et al.*, 2020). Este fato pode ter sido devido ao longo período de armazenamento dos antígenos conjugados à peroxidase. A conjugação ocorreu no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (Bio-Manguinhos, Fiocruz-RJ) em dezembro de 2016 e a padronização dos imunoenaios foi iniciada no LASP somente em agosto de 2019. A conjugação com novo lote de moléculas IBMP estava prevista para ser realizada no ano de 2020. Contudo, devido à crise sanitária mundial ocasionada pela pandemia do SARS-CoV-2, esta estratégia não pôde ser realizada. Uma nova conjugação será realizada em breve para a realização do estudo de fase II.

A despeito dos valores de sensibilidade encontrados pelo IBMP-DAS-ELISA serem inferiores àqueles reportados pelo IBMP-ELISA indireto (CORDEIRO *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2017a; SANTOS *et al.*, 2017b; SILVA *et al.*, 2020) o uso de duas moléculas em paralelo para a detecção da infecção, conforme preconizado pela OMS (WHO, 2002) e Ministério da Saúde (DIAS *et al.*, 2016), eleva os valores de sensibilidade para 98,5%, quando os testes são realizados empregando os antígenos IBMP-8.2 / IBMP-8.3. Valores inferiores, porém, superiores a 94%, foram descritos para as demais combinações de antígenos, quando usados em paralelo. Por outro lado, o uso do esquema em série não contribui para incremento do valor de sensibilidade. De fato, o valor máximo encontrado foi de 76,9% empregando os antígenos IBMP-8.2 / IBMP-8.3. Portanto, o esquema em série deve ser desencorajado para o diagnóstico da DC.

6.3 ESTUDO DA REATIVIDADE CRUZADA

Como observado no estudo de fase I, o IBMP-DAS-ELISA é um ensaio de alta especificidade, no qual o único antígeno que não atingiu o valor de 100% foi o IBMP-8.3. Para esta molécula, foram observados quatro resultados na zona cinza: HBC (n = 1; 10%), HBV (n = 1; 10%) e HTLV-1/2 (n = 2; ~22%).

Considerando a proximidade filogenética entre o *T. cruzi* e o gênero *Leishmania* spp., são esperadas reações cruzadas nos ensaios envolvendo técnicas sorológicas e antígenos brutos (SANTOS *et al.*, 2016a; SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001) e, por esse motivo, sugere-se a utilização de antígenos recombinantes para esta finalidade (BENEDETTI *et al.*, 2013). Para as moléculas IBMP, em avaliação por IBMP-ELISA indireto, este quantitativo foi baixo. Na avaliação da reatividade cruzada com leishmaniose cutânea os valores foram de 0,7% para IBMP-8.1 e IBMP-8.2 e 0,35% para IBMP-8.3. Para leishmaniose visceral, os valores foram nulos para IBMP-8.1, 3,49% para IBMP-8.2 e 0,58% para IBMP-8.3. O IBMP-8.4 não apresentou reação cruzada para nenhuma das formas clínicas de leishmaniose (DALTRO *et al.*,

2019). Os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 foram selecionados para avaliar a reatividade cruzada para leishmaniose visceral através do IBMP-DAS-ELISA, não sendo observada positividade para nenhuma delas, com índices de reatividade de 0,25 e 0,21, respectivamente. O baixo índice de reatividade cruzada nesta avaliação preliminar sugere que os antígenos IBMP podem ser utilizados para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* em áreas de co-endemicidade também pelo DAS-ELISA. Nossos dados estão de acordo com o reportado por Daltro e colaboradores, em 2019, que avaliaram a reatividade cruzada dos antígenos IBMP utilizando um painel amostral de 600 amostras positivas para leishmaniose tegumentar e 249 para leishmaniose visceral por ELISA indireto. Os índices de reatividade encontrados pelos autores foram muito baixos ou nulos quando comparados àqueles obtidos por testes comerciais. Contudo, avaliação com um número amostral superior será conduzida futuramente em um estudo de fase II, para confirmar nossos achados.

7 CONCLUSÕES

- Os antígenos recombinantes quiméricos IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 do *T. cruzi* são capazes de diferenciar amostras positivas de negativas para a doença de Chagas, apresentando elevada capacidade diagnóstica na plataforma DAS-ELISA;
- Apesar de apresentarem sensibilidades inferiores em comparação ao ELISA indireto, os antígenos IBMP do *T. cruzi* apresentaram capacidade diagnóstica em virtude de seus valores de AUC;
- Os antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.2 e IBMP-8.4 do *T. cruzi* apresentaram especificidades de 100%;
- O uso do esquema em paralelo elevou a sensibilidade do diagnóstico da infecção causada pelo *T. cruzi* para 98,5% empregando os antígenos IBMP-8.2 e IBMP-8.3 do *T. cruzi*;
- O esquema de avaliação em série dos antígenos do *T. cruzi* deve ser desencorajado por não elevar a sensibilidade dos testes;
- Não foram observadas reações cruzadas para *Leishmania* spp. para os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 do *T. cruzi*;
- O antígeno IBMP-8.3 do *T. cruzi* foi o único que apresentou resultados na zona cinza na avaliação da reatividade cruzada.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar a conjugação de novos lotes de antígenos IBMP à peroxidase;
- Otimizar o ensaio para utilização de menor volume de soro;
- Avaliar a utilização de diferentes antígenos IBMP como preparação antigênica e como agentes de detecção no mesmo ensaio;
- Avaliar o ensaio *one-step*, caracterizado pela adição simultânea da amostra sérica com o antígeno conjugado;
- Realização do estudo de fase II;
- Avaliar a plataforma para diagnóstico simultâneo da infecção pelo *T. cruzi* em humanos e em seus reservatórios.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. M.; EBELL, M. H.; TARLERTON, R.L. A Systematic Review of High-Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 11, Nov. 2012.
- ALMEIDA, A. B. *et al.* Sexual transmission of American trypanosomes from males and females to naive mates. **Journal of Visualized Experiments**, Boston, v. 143, p. 1–12, Jan. 2019.
- ANDRADE, A. Q. DE; GONTIJO, E. D. Triagem neonatal para infecção chagásica congênita: aplicação de análise de classe latente para avaliação dos testes diagnósticos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 6, p. 615–620, dez. 2008.
- ANDRADE, S. G. *et al.* Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 8, p. 948–956, dez. 2011.
- ARAUJO, F. G. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 53, n. 1, p. 179–185, July 1986.
- ARAUJO, P. F. *et al.* Sexual transmission of American trypanosomiasis in human: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 6, p. 437–466, jun. 2017.
- ASSIS, T. S. M.; RABELLO, A.; WERNECK, G. L. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 17, n. 10, p. 1202–1207, Oct. 2012.
- BANOO, S. *et al.* Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 9, p. 21-31, Sept. 2006.
- BASURCO, A. *et al.* Evaluation of the performance of three serological tests for diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs using latent class analysis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 1–10, set. 2020.

- BATISTA, C. *et al.* A four-step process for building sustainable access to diagnosis and treatment of Chagas disease. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 43, p. 1, Sept. 2019.
- BENEDETTI, A. F. V. *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.
- BERN, C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 4, p. 655-681, Oct. 2011.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 373, n. 5, p. 456–466, July 2015.
- BOELAERT, M. *et al.* 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.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Portaria nº 57, de 30 de outubro de 2018. Torna pública a decisão de aprovar o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da doença de Chagas, no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 out. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Diário Oficial da União – Seção 1, número 127, de 06 de julho de 2020. Resolução-RE Nº 2.281, de 2 de julho de 2020.
- BUENO, E. C.; VAZ, A. J. Imunoensaios de Aglutinação. *In*: VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C. **Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 54–61.
- BÜRGISSER, P. *et al.* Multicenter evaluation of new double-antigen sandwich enzyme immunoassay for measurement of anti-human immunodeficiency virus type 1 and type 2 antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 3, p. 634–637, Mar. 1996.
- BURLEIGH, B. A., ANDREWS, N. W. The Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* Invasion of Mammalian Cells. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, n. 1, p. 175-200, 1995.

- CAMUSSONE, C. *et al.* Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 16, n. 6, p. 899-905, June 2009.
- CARLIER, Y. *et al.* Congenital Chagas Disease: Recommendations for Diagnosis, Treatment and Control of Newborns, Siblings and Pregnant Women. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 10, p. e1250, Oct. 2011.
- CASTRO-SESQUEN, Y. E. *et al.* Use of a Latent Class Analysis in the Diagnosis of Chronic Chagas Disease in the Washington Metropolitan Area. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 72, n. 9, p. 303–310, 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.
- CEBALLOS-POMARES, J. C. *et al.* Inmunología de la enfermedad de Chagas congénita. **Perinatología y Reproducción Humana**, v. 31, n. 3, p. 144–150, sept. 2017.
- CEBUL, R D; HERSHEY, J C; WILLIAMS, S V. Using multiple tests: series and parallel approaches. **Clinics In Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 2, n. 4, p. 871-890, Dec. 1982.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Epidemiology & Risk Factors**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>>. Acesso em: 22 ago. 2019.
- CHAGAS, C. J. R. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, 159-218, ago. 1909.
- CHIARI, E. *et al.* Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 22, n. 1, p. 19–23, mar. 1989.
- CHEN, S. *et al.* Double-antigen sandwich ELISA for detection of antibodies to SARS-associated coronavirus in human serum. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 24, n. 8, p. 549–553, Aug. 2005.

- CHU, K. An introduction to sensitivity, specificity, predictive values and likelihood ratios. **Emergency Medicine Australasia**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 175–181, Sept. 1999.
- 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**, Oxford, v. 169, p. 112573, Dec. 2020.
- COURA, J. R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 8, p. 962–967, dez. 2013.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. suppl. 1, p. 31–40, jul. 2009.
- COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, London, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, June 2010.
- 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.1–10, Aug. 2019.
- DEL-REI, R. P. *et al.* Detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies by chimeric antigens in chronic Chagas disease-individuals from endemic South American countries. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 1, p. 1–12, Apr. 2019.
- DENG, L.; XU, Y.; HUANG, J. Developing a double-antigen sandwich ELISA for effective detection of human hepatitis B core antibody. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 515–526, Nov. 2008.
- DIAS, E. Técnica do xenodiagnostico na molestia de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, p. 335–342, ago. 1940.
- DIAS, J. C. P. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of the transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. suppl. 1, p. 11–18, out. 2007.
- DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Epidemiologia: vetores e reservatórios do *Trypanosoma cruzi*. In: DIAS, João Carlos Pinto; COURA, José Rodrigues (org.). **Clínica e terapêutica da doença**

de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. 20. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.

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

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

DIOTAIUTI, L. G. *et al.* Evaluation of the Chagas' disease vector control program in Minas Gerais, Brazil, with special reference to *Triatoma sordida*. Bulletin of the Pan American Health Organization, v. 28, n. 3, p. 211-219, 1994.

DONG, C. *et al.* Restricted enzooticity of hepatitis E virus genotypes 1 to 4 in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 12, p. 4164–4172, Dec. 2011.

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.

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

FLORES-CHAVEZ, M. D. *et al.* Evaluation of the Elecsys Chagas Assay for Detection of *Trypanosoma cruzi*-Specific Antibodies in a Multicenter Study in Europe and Latin America. **Journal Of Clinical Microbiology**, Washington, v. 56, n. 5, p. e01446-17, Feb. 2018.

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

GADELHA, A. A. M. **Avaliação do Desempenho do “Kit” EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos Frente ao ELISA Convencional e ao Teste de Hemaglutinação Indireta.** 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Recife-PE, Brasil, 2003.

GADELHA, A. A. M. *et al.* Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the hemagglutination test. **Vox Sanguinis**, Oxford, v. 85,

n. 3, p. 165–170, Oct. 2003.

GE, M. *et al.* Development and Application of a Double-Antigen Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies to Porcine Circovirus 2. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 19, n.9, p. 1480–1486, July 2012.

GOMES, C. *et al.* American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 81, p. 81–84, Apr. 2019.

GOMES, Y. M. PCR and Sero-Diagnosis of Chronic Chagas' Disease. Biotechnological Advances. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 66, n. 2, p. 107–119, May 1997.

GOMES, Y. M. *et al.* Serodiagnosis of Chronic Chagas Infection by Using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos Kit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 4, p. 497–501, mai. 2001.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 115-121, jul. 2009.

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

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

GÜRTLER, R. E. *et al.* Domestic animal hosts strongly influence human-feeding rates of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Argentina. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e2894, May 2014.

GUZMÁN-GOMEZ, D. *et al.* Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: Role of the antigen used for diagnostic. **Parasites and Vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 466, Dec. 2015.

HE, J. *et al.* Double-antigen sandwich ELISA for detection of anti-hepatitis C virus antibodies. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 171, n.1, p. 163–168, Jan. 2011.

- HERNÁNDEZ, L. M. *et al.* Brote de Chagas Agudo en Lebrija, Santander 2008. **Revista del Observatorio Salud Pública de Santander**, Santander, v. 4. n. 1 p. 28–36, enero 2009.
- HERNÁNDEZ, P. *et al.* Highly Effective Serodiagnosis for Chagas' Disease. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 17, n. 10, p. 1598–1604, Oct. 2010.
- 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.
- HORNER, P. J. *et al.* *Chlamydia trachomatis* Pgp3 antibody persists and correlates with self-reported infection and behavioural risks in a blinded cohort study. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 3, p. e0151497, Mar. 2016.
- 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.
- HU, W. P. *et al.* Double-Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Hepatitis E Virus-Specific Antibodies in Human or Swine Sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, n. 8, p. 1151–1157, Aug. 2008.
- IMAI, K. *et al.* Optimization and evaluation of the ARCHITECT Chagas assay and in-house ELISA for Chagas disease in clinical settings in Japan. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 80, n. February 2021, p. 10222, Feb. 2021.
- JIAO, Y. *et al.* Preparation and Evaluation of Recombinant Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Nucleocapsid Protein for Detection of Total Antibodies in Human and Animal Sera by Double-Antigen Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 2, p. 372–377, Feb. 2012.
- KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, ciências, saúde - Mangueiras**, Rio de Janeiro, v. 16 n. 1, p. 13–34, jul. 2009.
- KROPF, S. P. **Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação (1909-1962)**. 2006. 546 f. Tese (Doutorado em História Social) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

- 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
- LEEFLANG, M. M. G. *et al.* Variation of a test's sensitivity and specificity with disease prevalence. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 185, n. 11, p. 537–544, Aug. 2013.
- LEEFLANG, M. M. G.; BOSSUYT, P. M. M.; IRWIG, L. Diagnostic test accuracy may vary with prevalence: implications for evidence-based diagnosis. **Journal of Clinical Epidemiology**, New York, v. 62, n. 1, p. 5–12, Jan. 2009.
- 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. 1–16, June 2019.
- LI, A. *et al.* Novel Double-Antigen Sandwich Immunoassay for Human Hepatitis B Core Antibody. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 17, n. 3, p. 464–469, Mar. 2010.
- LIU, J. *et al.* Evaluation of immunity to varicella zoster virus with a novel double antigen sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 100, n. 21, p. 9321–9329, Nov. 2016.
- LUQUETTI, A. O.; SCHMUNIS, G. Diagnosis of *T. cruzi* infection. In: TELLERIA, J.; TIABYRENC, M. (Org.). **American Trypanosomiasis. Chagas Disease One Hundred Years of Research**. Madrid: Elsevier, 2010. p. 743-747.
- MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas Heart Disease: An Update. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 128, n. 11, p. 1251.e7–1251.e9, Nov. 2015.
- MARTIN, D. L. *et al.* Regional Variation in the Correlation of Antibody and T-Cell Responses to *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 90, n. 6, p. 1074–1081, June 2014.
- MÉDECINS SANS FRONTIÈRES. Campaign for Access to Essential Medicines (2008). International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 3, p. 315-319, mai/jun. 2008.

- MEDRONHO, R. A. *et al.* **Epidemiologia**. 2a. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009, pp. 13-30.
- MIYAZAWA, H. *et al.* A Reverse-Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Verocytotoxin 1 and 2 Antibodies in Human and Bovine Sera. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 6, n. 5, p. 701 – 704, Sept. 1999.
- MORAES, M. H. *et al.* Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasites & Vectors**, London, v. 1 n. 1 p. 20, July 2008.
- MONCAYO, A. Chagas Disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 577–591, jul. 2003.
- MONCAYO, A.; LUQUETTI, A. O. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 489-495, dez. 1990.
- MURCIA, L. *et al.* Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 31, n.1, p. 26–34, feb. 2013.
- NAKAZAWA, M. *et al.* Excretory-Secretory Antigens of *Trypanosoma cruzi* Are Potentially Useful for Serodiagnosis of Chronic Chagas' Disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, n. 5, p. 1024–1027, Sept. 2001.
- NOYA, B. A. *et al.* Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 377–386, abr. 2015.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: parasitosis**. Washington, 2003. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/711/9275119936.pdf?sequence=2&isAllowed=y>>. Acesso em: 22 out. 2019.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas Disease**. Washington, 2019. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49653/9789275120439_eng.pdf?sequence=6&isAllowed=y>. Acesso em: 30 out. 2019.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **General Information – Chagas disease.**

Washington: [s.n.], 2019. Disponível em:

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=en. Acesso em: 29 nov. 2019.

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

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

RASSI, A.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' Heart Disease. **Clinical Cardiology**, New York, v. 23, n. 12, p. 883–889, Dec. 2000.

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

RASSI, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 275–291, June 2012.

SAAH, A. J.; HOOVER, D. R. “Sensitivity” and “Specificity” Reconsidered: The Meaning of These Terms in Analytical and Diagnostic Settings. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, n. 1 p. 91, Jan. 1997.

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

SANTOS, E. F. *et al.* Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: a nationwide spatiotemporal analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 14, n. 8, p. 0008445, Aug. 2020.

SANTOS, E. F. **Avaliação de antígenos quiméricos do *Trypanosoma cruzi* para diagnóstico da doença de Chagas em bancos de sangue.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador-BA, Brasil, 2020.

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 2016a.

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

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

SANTOS, F. L. N. *et al.* Performance Assessment of a *Trypanosoma cruzi* Chimeric Antigen in Multiplex Liquid Microarray Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 55, n. 10, p. 2934–2945, Oct. 2017b.

SANTOS, F. L. N. *et al.* Highly Accurate Chimeric Proteins for the Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: A Latent Class Analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 99, n. 5, p. 1174–1179, Nov. 2018.

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

SARLI, M. *et al.*, Development and evaluation of a double-antigen sandwich ELISA to identify *Anaplasma marginale*-infected and *A. centrale*-vaccinated cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 32, n. 1, p. 70–76, Jan. 2020.

SAS, M. A. *et al.* A novel double-antigen sandwich ELISA for the species-independent detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-specific antibodies. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 24–26, Mar. 2018.

SCHIJMAN, A. G. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 184, p. 59–66, Aug. 2018.

SCHMUNIS G. A. Tripanossomíase Americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (Orgs.) **Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral**. 2. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. p. 11-24.

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

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

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

SILVA, E. D. *et al.* Use of the EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos Kit to Monitor Cure of Human Chagas' Disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 16, n. 3, p. 132–136, Feb. 2002.

SILVA, E. D. *et al.* Development of a New Lateral Flow Assay Based on IBMP-8.1 and IBMP-8.4 Chimeric Antigens to Diagnose Chagas Disease. **BioMed Research International**, New York, v. 2020, p. 1–9, Aug. 2020.

SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 286–291, June 2001.

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

SOUZA, W. O Parasito e Sua Interação com os Hospedeiros. *In*: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 200. p. 88–123.

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

STORINO, R.; JÖRG, M. E. Vías de infección y aspectos clínicos. *In*: STORINI, R.; MILEI, J (Ed.) **Enfermedad de Chagas**. Argentina: Doyma, 1994.

SWETS, J. A. Measuring the Accuracy of Diagnostic Systems. **Science**, v. 240, n. 4857, p. 1285–1293, jun. 1988.

TARLETON, R. L. *et al.* The challenges of Chagas disease – Grim outlook or glimmer of hope? **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 4, n. 12, p. 1852–1857, Dec. 2007.

UMEZAWA, E. S. *et al.* Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chaga's Disease in South and Central America. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 37, n. 15, p. 1554–1560, May 1999

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

VARGAS, J. S. *et al.* Primer brote reportado de la enfermedad de Chagas en la Amazonía Boliviana: reporte de 14 casos agudos por transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* en Guayaramerín, Beni-Bolivia. **BIOFARBO**, La Paz, v. 19, n. 1., p. 52–58, jun. 2011.

VARGAS, A. *et al.* Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 1, p. 1–8, fev. 2018.

VERANI, J. R. *et al.* Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, n. 3, p. 410–415 Mar. 2009.

VERGARA, U. *et al.* Assay for Detection of *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Human Sera Based on Reaction with Synthetic Peptides. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 9, p. 2034–2037, Sept. 1991.

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.

VOLLER, A. *et al.* Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. **The Lancet**, London, v. 1, n. 7904, p. 426–428, Feb. 1975.

WANG, Q. *et al.* Urea-mediated dissociation alleviate the false-positive *Treponema pallidum*-specific antibodies detected by ELISA. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 3, p. e0212893, Feb. 2019.

WATCHARATANYATIP, K. *et al.* Multispecies detection of antibodies to influenza A viruses by a double-antigen sandwich ELISA. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam. v. 163, n. 2, p. 238–243, Feb. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**.

Genève: [s.n.], 2019. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 17 ago. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. **WHO Technical Report Series**. Geneva, 2002.

WU, F. *et al.* Double-antigen sandwich time-resolved immunofluorometric assay for the detection of anti-hepatitis C virus total antibodies with improved specificity and sensitivity. **Journal Of Medical Microbiology**, London, v. 57, n. 8, p. 947-953, Aug. 2008.

XIE, L. *et al.* Detection of Antibody to Hepatitis Delta Virus in Human Serum by Double Antigen Sandwich ELISA. **Virologica Sinica**, Beijing, v. 24, n. 1, p. 45–51, Feb. 2009.

YANG, L.-M *et al.* A Novel Double-Antigen Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Antibodies against Rabies Virus. **Clinical and Vaccine Immunology**. Washington, v. 13, n.8, p. 966–968, Aug. 2006.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, nov. 2009.

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

APÊNDICE A

Resultado das análises do IBMP-ELISA indireto e do IBMP-DAS-ELISA, estudo de fase I

Código	IBMP-ELISA indireto (IR) IBMP				Teste de referência LCA	IBMP-DAS-ELISA (IR) IBMP			
	8.1	8.2	8.3	8.4		8.1	8.2	8.3	8.4
LACEN/BA-1	2.16	1.43	2.06	2.22	POS	0.31	0.07	1.25	0.38
LACEN/BA-3	4.82	1.29	2.05	3.07	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-4	2.72	1.34	1.53	2.42	POS	0.82	1.27	1.16	1.06
LACEN/BA-5	4.72	3.87	2.82	3.28	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-7	3.63	4.10	2.53	2.89	POS	5.48	2.61	3.52	1.93
LACEN/BA-9	3.78	1.79	2.31	2.89	POS	4.30	1.67	3.69	1.89
LACEN/BA-11	2.98	2.43	2.19	3.01	POS	0.74	1.36	2.90	2.22
LACEN/BA-13	2.59	2.66	1.86	2.35	POS	1.13	1.05	3.18	0.24
LACEN/BA-14	3.92	4.04	3.36	3.58	POS	0.70	3.75	4.56	3.75
LACEN/BA-15	3.48	3.39	3.32	2.73	POS	2.64	2.85	3.48	2.73
LACEN/BA-16	4.62	3.71	2.41	3.87	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-20	4.97	2.90	2.98	3.42	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-21	4.08	2.68	3.01	2.57	POS	1.02	2.25	2.47	2.75
LACEN/BA-22	2.92	2.03	2.72	2.74	POS	0.66	0.26	5.32	0.61
LACEN/BA-24	1.28	1.55	2.64	2.53	POS	0.50	2.05	3.18	3.68
LACEN/BA-25	1.98	1.42	2.16	1.72	POS	0.54	2.70	3.33	1.45
LACEN/BA-26	3.08	1.40	2.75	2.59	POS	1.83	0.83	3.51	1.55
LACEN/BA-27	2.98	2.00	2.68	2.38	POS	1.08	1.57	3.32	1.11
LACEN/BA-28	2.56	1.95	1.30	2.09	POS	1.08	0.08	2.90	0.20
LACEN/BA-29	2.00	1.72	2.52	1.44	POS	0.84	2.37	3.82	1.64
LACEN/BA-30	4.23	2.95	3.29	3.68	POS	5.78	2.20	3.53	2.43
LACEN/BA-31	3.54	3.34	2.56	3.30	POS	2.79	2.37	1.69	2.59
LACEN/BA-32	4.22	2.14	3.06	2.95	POS	5.08	1.86	3.86	1.89
LACEN/BA-33	3.16	1.87	3.31	2.84	POS	2.14	1.93	4.19	3.37
LACEN/BA-34	2.95	2.13	3.14	2.13	POS	0.66	1.56	2.63	1.59
LACEN/BA-35	3.58	2.46	1.66	3.62	POS	0.50	2.67	3.63	4.00
LACEN/BA-36	3.27	2.05	2.25	2.98	POS	0.80	0.10	2.17	1.13
LACEN/BA-38	4.97	2.96	3.03	3.83	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-40	4.44	3.21	2.66	3.16	POS	3.56	2.35	3.34	2.07
LACEN/BA-41	3.82	1.71	2.83	3.18	POS	1.06	2.33	2.84	3.00
LACEN/BA-42	3.77	2.98	3.32	2.93	POS	0.87	2.68	2.53	1.62
LACEN/BA-45	3.36	3.04	3.27	3.20	POS	2.43	3.03	4.69	4.24
LACEN/BA-47	2.49	3.34	2.85	2.92	POS	3.35	2.90	5.32	3.60
LACEN/BA-48	3.46	2.89	2.69	2.21	POS	0.46	1.65	3.42	1.41
LACEN/BA-50	2.84	2.43	2.58	2.27	POS	1.57	2.01	3.68	3.22
LACEN/BA-51	4.72	3.27	2.79	3.48	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-52	3.21	1.94	2.71	2.62	POS	5.79	1.48	3.50	2.56

Código	IBMP-ELISA indireto (IR)				Teste de referência	IBMP-DAS-ELISA (IR)			
	IBMP					LCA	IBMP		
	8.1	8.2	8.3	8.4			8.1	8.2	8.3
LACEN/BA-53	3.45	1.60	2.31	2.41	POS	0.96	1.20	1.80	2.64
LACEN/BA-54	5.41	3.09	2.95	3.13	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-56	3.47	2.75	3.51	2.99	POS	1.02	2.30	3.80	2.52
LACEN/BA-57	2.83	1.81	2.25	2.30	POS	24.20	1.33	5.32	4.39
LACEN/BA-58	4.01	2.57	3.20	2.68	POS	2.94	2.36	3.01	2.43
LACEN/BA-59	2.35	2.32	2.48	2.05	POS	0.54	2.21	3.16	1.79
LACEN/BA-60	2.27	1.46	2.46	2.03	POS	3.26	1.07	1.75	1.29
LACEN/BA-61	3.49	2.64	2.13	2.32	POS	1.62	1.67	1.27	0.65
LACEN/BA-62	3.28	1.74	1.73	2.44	POS	2.83	0.44	1.09	0.54
LACEN/BA-63	5.46	3.55	2.60	3.20	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-64	3.53	3.10	3.13	3.04	POS	0.69	3.24	3.26	6.41
LACEN/BA-65	3.65	1.87	3.00	2.46	POS	2.24	2.53	2.95	1.65
LACEN/BA-66	2.43	1.44	2.60	1.79	POS	1.54	1.91	3.19	1.25
LACEN/BA-67	3.85	2.11	2.94	2.53	POS	1.17	2.76	3.22	3.01
LACEN/BA-68	3.35	1.66	2.16	2.45	POS	1.06	1.43	3.73	2.77
LACEN/BA-69	3.43	1.86	2.83	2.48	POS	1.19	2.46	2.45	2.34
LACEN/BA-70	3.64	2.96	2.79	3.11	POS	2.30	1.93	2.16	1.95
LACEN/BA-71	3.69	3.32	2.61	2.76	POS	2.92	2.10	2.51	1.08
LACEN/BA-72	3.59	2.11	2.99	2.46	POS	0.61	0.14	1.84	0.43
LACEN/BA-73	2.27	1.91	3.08	2.75	POS	1.16	1.60	3.22	2.97
LACEN/BA-74	3.05	2.17	3.15	2.74	POS	3.23	0.26	3.68	4.11
LACEN/BA-76	3.64	1.83	2.04	1.89	POS	2.53	1.38	4.40	0.53
LACEN/BA-78	3.51	2.77	3.03	3.27	POS	4.75	2.97	3.75	4.08
LACEN/BA-79	3.65	3.48	3.04	3.35	POS	4.46	2.27	2.40	2.43
LACEN/BA-80	2.76	1.38	3.71	2.19	POS	0.90	0.14	4.16	0.38
LACEN/BA-81	2.07	1.00	1.87	1.22	POS	0.39	0.09	2.04	0.41
LACEN/BA-85	1.49	1.62	1.84	1.12	POS	0.35	2.21	3.58	1.5
LACEN/BA-89	1.55	1.44	1.81	1.04	POS	1.82	0.39	2.65	1.2
LACEN/BA-90	2.66	1.52	2.39	1.77	POS	3.68	2.37	2.99	1.29
LACEN/BA-91	3.36	2.04	3.12	2.64	POS	4.03	1.79	3.46	2.99
LACEN/BA-92	2.49	1.34	2.82	2.24	POS	4.56	2.55	3.78	4.8
LACEN/BA-93	2.11	1.15	2.45	1.71	POS	1.60	1.86	4.45	2.0
LACEN/BA-95	1.84	1.28	1.88	1.18	POS	2.20	1.83	3.30	2.1
LACEN/BA-96	2.34	1.11	2.21	1.25	POS	1.37	1.78	3.47	1.7
LACEN/BA-102	1.18	1.27	2.00	1.01	POS	0.34	1.00	2.71	0.8
LACEN/BA-106	2.74	1.51	2.35	1.60	POS	0.44	1.24	2.90	0.81
LACEN/BA-115	2.65	1.38	2.46	1.78	POS	3.79	1.70	3.29	5.18
LACEN/BA-116	3.83	1.41	2.96	1.79	POS	0.58	2.31	2.77	2.97
LACEN/BA-126	4.07	3.10	3.23	2.00	POS	2.18	2.32	4.10	4.17
LACEN/BA-128	1.68	1.22	2.23	1.26	POS	1.04	1.11	4.86	4.1
LACEN/BA-129	3.90	3.78	3.47	2.37	POS	2.67	2.73	3.54	2.65
LACEN/BA-133	3.04	1.52	2.50	1.40	POS	1.89	2.35	3.01	3.09

Código	IBMP-ELISA indireto (IR)				Teste de referência	IBMP-DAS-ELISA (IR)			
	IBMP					LCA	IBMP		
	8.1	8.2	8.3	8.4			8.1	8.2	8.3
LACEN/BA-136	1.44	1.87	1.99	1.18	POS	0.94	2.70	2.88	3.5
LACEN/BA-137	4.45	3.19	3.07	1.88	POS	5.17	2.19	2.17	2.08
LACEN/BA-139	3.53	1.59	2.38	2.13	POS	8.19	3.17	4.86	5.4
LACEN/BA-142	1.94	1.67	2.74	1.21	POS	1.38	2.22	3.40	6.21
LACEN/BA-145	2.06	2.00	2.40	1.32	POS	1.13	1.59	2.26	3.19
LACEN/BA-146	2.43	1.36	2.43	1.09	POS	2.65	2.28	2.42	1.51
LACEN/BA-148	2.58	1.01	2.39	1.36	POS	17.67	2.15	3.91	2.9
LACEN/BA-149	3.58	1.24	1.44	1.82	POS	5.09	1.26	3.07	1.54
LACEN/BA-150	3.73	2.49	2.99	1.95	POS	5.38	1.87	2.40	2.04
LACEN/BA-155	1.36	1.72	1.46	1.52	POS	1.99	2.26	2.03	1.46
LACEN/BA-158	1.77	1.94	2.78	1.43	POS	0.75	1.28	2.60	2.62
LACEN/BA-160	1.84	1.02	2.10	1.35	POS	0.40	1.76	1.39	3.5
LACEN/BA-161	5.20	3.16	3.13	2.46	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-162	4.74	3.11	3.51	2.81	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-164	1.88	1.31	1.57	1.16	POS	1.09	2.12	1.18	3.23
LACEN/BA-166	3.23	1.91	3.58	2.37	POS	2.31	1.83	2.18	3.37
LACEN/BA-167	3.12	1.30	3.23	1.93	POS	1.17	1.70	2.33	1.74
LACEN/BA-169	2.12	1.54	2.07	1.10	POS	0.47	2.01	1.50	2.28
LACEN/BA-170	3.74	1.51	3.48	1.45	POS	2.86	3.17	3.35	3.00
LACEN/BA-171	4.04	2.89	2.99	2.17	POS	0.56	2.45	1.86	2.05
LACEN/BA-173	4.27	1.57	3.21	1.66	POS	1.16	2.29	1.63	1.82
LACEN/BA-174	2.99	2.56	3.89	1.80	POS	0.55	1.62	1.41	3.70
LACEN/BA-176	5.30	3.49	3.90	3.37	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-177	2.24	1.14	1.40	1.57	POS	2.50	0.79	0.50	0.42
LACEN/BA-180	3.76	3.47	3.18	3.49	POS	4.32	1.39	1.10	4.62
LACEN/BA-181	3.86	3.38	3.91	3.31	POS	1.22	2.76	3.39	1.09
LACEN/BA-182	2.53	2.37	3.39	1.94	POS	0.45	0.76	1.74	1.33
LACEN/BA-183	1.98	3.07	2.53	1.85	POS	2.13	0.83	2.11	1.15
LACEN/BA-184	3.17	1.37	3.27	1.71	POS	1.47	2.69	2.27	2.33
LACEN/BA-185	1.87	2.02	2.52	2.04	POS	0.44	0.09	1.84	5.80
LACEN/BA-187	2.40	3.54	3.33	2.34	POS	1.17	1.85	1.90	1.43
LACEN/BA-188	4.64	3.52	3.84	3.55	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-189	3.06	4.32	3.71	3.04	POS	15.55	3.81	3.70	9.70
LACEN/BA-190	4.23	4.28	3.87	3.27	POS	1.61	5.08	2.48	7.19
LACEN/BA-191	2.25	3.35	3.51	1.63	POS	0.51	1.30	2.01	1.44
LACEN/BA-192	3.85	3.33	3.73	3.32	POS	5.56	3.52	2.73	3.13
LACEN/BA-193	3.42	3.53	2.86	2.49	POS	0.91	2.26	0.85	1.10
LACEN/BA-194	3.90	2.93	3.39	1.88	POS	4.02	2.93	2.91	1.54
LACEN/BA-195	3.31	3.84	3.46	2.30	POS	1.19	2.23	1.20	1.67
LACEN/BA-196	4.57	1.58	1.33	2.43	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-197	2.93	3.57	3.19	2.80	POS	1.91	2.90	1.93	3.72
LACEN/BA-198	1.57	1.58	2.23	1.12	POS	0.52	0.15	1.48	0.98

Código	IBMP-ELISA indireto (IR)				Teste de referência	IBMP-DAS-ELISA (IR)			
	IBMP					LCA	IBMP		
	8.1	8.2	8.3	8.4			8.1	8.2	8.3
LACEN/BA-199	2.63	5.08	3.10	1.42	POS	1.43	2.99	1.19	4.87
LACEN/BA-201	2.54	3.08	3.48	2.57	POS	1.73	1.78	4.03	1.77
LACEN/BA-202	4.65	4.69	3.27	2.37	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-204	1.50	1.01	1.91	1.07	POS	0.41	0.33	0.91	2.05
LACEN/BA-205	4.46	4.68	3.77	3.26	POS	5.25	2.96	3.11	5.36
LACEN/BA-206	4.93	3.81	3.51	3.10	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-207	3.93	4.06	3.11	2.78	POS	6.33	2.71	3.34	2.05
LACEN/BA-208	4.21	2.50	2.92	2.42	POS	3.62	1.29	1.08	0.96
LACEN/BA-209	2.14	2.42	2.95	2.02	POS	21.90	1.58	4.32	5.28
LACEN/BA-210	2.75	3.76	3.20	1.63	POS	0.89	2.38	3.39	5.77
LACEN/BA-211	1.74	1.28	2.81	1.32	POS	0.65	1.04	1.83	1.94
LACEN/BA-212	1.78	2.97	1.28	1.65	POS	0.27	0.29	0.10	0.49
LACEN/BA-213	2.91	3.18	3.57	2.75	POS	4.28	3.09	2.80	4.14
LACEN/BA-215	2.17	2.45	2.94	1.44	POS	0.75	1.88	1.69	2.24
LACEN/BA-216	3.33	1.66	3.31	2.48	POS	3.46	1.86	1.90	2.12
LACEN/BA-217	3.17	2.77	3.26	2.73	POS	2.26	1.32	2.21	4.84
LACEN/BA-218	2.98	2.80	2.89	1.36	POS	17.01	4.06	4.26	4.04
LACEN/BA-219	3.52	3.34	4.58	2.36	POS	19.05	5.20	3.43	3.52
LACEN/BA-220	2.19	1.35	3.22	2.83	POS	0.35	0.09	1.61	1.30
LACEN/BA-221	4.31	3.93	3.78	3.28	POS	5.75	2.89	1.81	3.74
LACEN/BA-223	3.37	4.09	3.48	2.02	POS	6.08	1.89	2.79	1.42
LACEN/BA-224	3.82	2.14	2.88	2.44	POS	3.09	2.06	1.98	1.64
LACEN/BA-225	2.31	5.16	3.53	2.50	POS	0.67	3.22	2.44	4.13
LACEN/BA-228	3.59	3.30	3.67	2.96	POS	2.58	2.98	2.82	2.84
LACEN/BA-229	3.59	4.63	3.31	3.14	POS	1.84	3.39	1.98	3.73
LACEN/BA-230	2.84	3.66	2.82	2.31	POS	3.53	2.25	2.26	0.96
LACEN/BA-231	2.53	4.46	3.46	3.29	POS	0.53	1.98	2.43	2.81
LACEN/BA-233	2.88	5.07	3.29	2.48	POS	0.53	3.82	2.91	3.10
LACEN/BA-234	3.62	1.74	3.27	2.09	POS	1.22	0.20	1.28	0.68
LACEN/BA-235	4.17	4.71	3.76	2.88	POS	0.55	3.50	1.57	0.81
LACEN/BA-236	3.73	2.73	3.58	3.46	POS	0.92	2.21	2.53	4.32
LACEN/BA-237	4.23	2.02	3.94	4.25	POS	1.96	1.61	3.28	3.65
LACEN/BA-238	1.81	1.98	2.89	1.49	POS	14.38	2.58	3.17	3.61
LACEN/BA-239	1.65	4.50	3.96	2.01	POS	0.46	2.91	3.67	2.57
LACEN/BA-240	2.76	1.53	3.05	1.78	POS	1.55	0.69	3.92	0.95
LACEN/BA-241	4.56	3.91	3.66	2.93	POS	6.18	3.03	2.78	2.31
LACEN/BA-242	3.91	1.65	3.07	2.42	POS	3.28	2.16	2.45	1.22
LACEN/BA-243	3.64	5.39	3.51	2.95	POS	1.80	2.90	1.22	3.90
LACEN/BA-244	3.29	1.93	3.34	3.09	POS	1.50	2.20	2.26	2.35
LACEN/BA-245	3.43	3.06	3.57	2.92	POS	2.34	2.19	2.41	1.89
LACEN/BA-246	2.28	1.06	1.67	1.52	POS	2.14	0.08	1.98	0.67
LACEN/BA-247	2.48	4.17	3.27	1.62	POS	2.90	2.71	1.52	1.26

Código	IBMP-ELISA indireto (IR)				Teste de referência	IBMP-DAS-ELISA (IR)			
	IBMP					LCA	IBMP		
	8.1	8.2	8.3	8.4			8.1	8.2	8.3
LACEN/BA-248	2.71	2.38	2.11	2.14	POS	0.36	0.08	0.60	0.14
LACEN/BA-249	1.59	1.65	2.22	1.01	POS	0.33	1.11	1.18	0.34
LACEN/BA-250	2.61	2.68	3.44	1.94	POS	0.32	0.62	2.10	1.12
LACEN/BA-251	4.63	4.16	3.69	3.33	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-252	4.67	2.30	3.56	4.04	POS	3.60	2.20	0.62	0.99
LACEN/BA-255	3.21	4.34	3.67	3.21	POS	4.68	2.76	1.70	1.46
LACEN/BA-256	3.76	2.07	3.31	3.09	POS	1.82	1.12	2.15	1.42
LACEN/BA-257	2.29	2.62	2.29	1.47	POS	0.37	0.11	0.54	0.17
LACEN/BA-258	1.53	1.59	1.66	1.92	POS	6.34	2.07	2.18	2.41
LACEN/BA-260	1.57	2.26	1.80	2.07	POS	3.11	3.29	2.62	4.80
LACEN/BA-261	1.68	1.86	1.41	2.36	POS	5.52	2.55	2.40	2.54
LACEN/BA-264	1.72	2.49	1.81	1.70	POS	3.08	3.09	1.77	2.37
LACEN/BA-266	1.40	1.47	1.89	1.45	POS	4.75	2.87	2.42	1.11
LACEN/BA-267	1.89	2.05	1.75	1.88	POS	5.05	2.38	2.13	2.51
LACEN/BA-268	1.67	1.80	1.84	2.03	POS	9.37	1.85	2.53	4.95
LACEN/BA-269	1.58	1.67	1.71	1.74	POS	3.06	1.95	1.25	1.78
LACEN/BA-270	2.03	1.88	1.88	1.78	POS	4.69	2.83	2.57	3.21
LACEN/BA-271	1.85	1.77	1.56	1.65	POS	17.84	3.23	2.02	5.23
LACEN/BA-272	1.47	1.90	1.86	1.31	POS	0.73	2.17	2.18	2.57
LACEN/BA-273	1.99	2.26	1.94	1.89	POS	3.93	3.28	1.55	3.83
LACEN/BA-274	1.94	2.23	1.92	2.29	POS	3.75	2.68	1.95	3.87
LACEN/BA-277	1.37	1.21	1.42	1.47	POS	2.73	0.17	0.93	1.18
LACEN/BA-278	1.79	2.14	2.02	1.92	POS	13.19	3.69	2.53	3.34
LACEN/BA-280	1.52	2.39	1.33	1.25	POS	0.58	2.92	1.22	2.57
LACEN/BA-281	2.06	1.99	1.76	1.83	POS	4.47	2.86	2.32	4.04
LACEN/BA-282	2.01	2.22	1.55	1.72	POS	6.30	3.24	1.32	3.74
LACEN/BA-283	1.28	2.05	1.72	1.47	POS	1.38	3.43	1.52	3.58
LACEN/BA-284	1.85	1.87	1.73	1.83	POS	2.24	2.46	1.58	1.72
LACEN/BA-286	1.94	1.99	2.11	2.14	POS	8.19	3.38	2.70	4.45
LACEN/BA-290	1.68	2.05	1.98	1.78	POS	1.88	2.54	1.99	3.15
LACEN/BA-293	1.61	1.28	1.57	2.61	POS	3.59	2.44	2.05	2.44
LACEN/BA-294	1.42	1.90	2.18	1.84	POS	1.07	3.11	2.61	3.64
LACEN/BA-295	2.03	1.05	1.86	1.44	POS	2.05	3.40	2.16	1.30
LACEN/BA-296	1.65	1.25	1.06	1.19	POS	7.95	0.16	2.30	0.79
LACEN/BA-297	1.92	2.11	2.02	1.95	POS	1.32	2.74	2.60	5.90
LACEN/BA-298	1.12	1.65	1.65	1.45	POS	0.42	1.84	2.37	0.43
LACEN/BA-299	1.76	1.42	1.56	1.57	POS	7.70	2.15	1.81	2.30
LACEN/BA-300	1.20	1.03	1.19	1.36	POS	1.29	1.53	1.42	1.54
LACEN/BA-304	1.49	1.27	1.63	1.31	POS	20.22	1.76	2.68	4.00
LACEN/BA-306	1.68	1.46	2.01	1.76	POS	2.32	4.16	2.56	3.52
LACEN/BA-307	1.91	2.43	1.79	2.24	POS	5.54	3.78	2.55	3.69
LACEN/BA-308	1.15	1.43	1.74	1.71	POS	1.02	2.98	1.89	3.25

Código	IBMP-ELISA indireto (IR)				Teste de referência	IBMP-DAS-ELISA (IR)			
	IBMP					LCA	IBMP		
	8.1	8.2	8.3	8.4			8.1	8.2	8.3
LACEN/BA-310	1.41	1.29	1.58	1.16	POS	3.60	2.54	2.09	1.93
LACEN/BA-311	1.37	1.48	1.46	1.27	POS	1.10	1.96	2.08	1.26
HEMOBA-1923	0.18	0.28	0.18	0.12	NEG	0.44	0.07	0.86	0.34
HEMOBA-1924	0.16	0.21	0.21	0.16	NEG	0.28	0.07	0.09	0.35
HEMOBA-1925	0.15	0.19	0.16	0.14	NEG	0.28	0.06	0.06	0.27
HEMOBA-1926	0.19	0.24	0.27	0.21	NEG	0.35	0.06	2.02	0.34
HEMOBA-1927	0.27	0.25	0.36	0.34	NEG	0.33	0.07	0.07	0.34
HEMOBA-1928	0.30	0.31	0.24	0.19	NEG	0.27	0.06	0.13	0.31
HEMOBA-1929	0.22	0.26	0.22	0.08	NEG	0.27	0.07	0.09	0.27
HEMOBA-1930	0.23	0.26	0.24	0.16	NEG	0.28	0.07	0.09	0.30
HEMOBA-1931	0.13	0.16	0.34	0.08	NEG	0.31	0.08	0.17	0.28
HEMOBA-1932	0.20	0.18	0.15	0.11	NEG	0.30	0.07	0.13	0.37
HEMOBA-1933	0.24	0.26	0.21	0.27	NEG	0.29	0.07	0.08	0.29
HEMOBA-1934	0.19	0.16	0.16	0.13	NEG	0.28	0.08	0.08	0.29
HEMOBA-1935	0.23	0.34	0.28	0.20	NEG	0.29	0.06	0.17	0.28
HEMOBA-1936	0.32	0.35	0.25	0.22	NEG	0.30	0.06	0.07	0.31
HEMOBA-1937	0.29	0.33	0.16	0.15	NEG	0.28	0.07	0.09	0.27
HEMOBA-1938	0.42	0.23	0.20	0.31	NEG	0.28	0.06	0.10	0.33
HEMOBA-1939	0.31	0.38	0.33	0.18	NEG	0.34	0.06	0.29	0.30
HEMOBA-1940	0.30	0.26	0.17	0.34	NEG	0.28	0.07	0.14	0.26
HEMOBA-1941	0.16	0.17	0.16	0.24	NEG	0.41	0.07	0.28	0.32
HEMOBA-1942	0.26	0.23	0.21	0.25	NEG	0.29	0.07	0.47	0.30
HEMOBA-1943	0.18	0.24	0.22	0.13	NEG	0.33	0.07	0.16	0.31
HEMOBA-1944	0.38	0.68	0.33	0.23	NEG	0.32	0.06	1.51	0.33
HEMOBA-1945	0.36	0.37	0.21	0.30	NEG	0.33	0.06	0.11	0.30
HEMOBA-1946	0.37	0.31	0.21	0.13	NEG	0.21	0.06	0.38	0.31
HEMOBA-1947	0.17	0.19	0.15	0.13	NEG	0.33	0.07	0.25	0.29
HEMOBA-1948	0.31	0.38	0.27	0.22	NEG	0.32	0.06	0.14	0.46
HEMOBA-1949	0.56	0.28	0.06	0.28	NEG	0.33	0.06	0.08	0.31
HEMOBA-1950	0.25	0.43	0.31	0.23	NEG	0.32	0.06	0.07	0.30
HEMOBA-1951	0.27	0.71	0.25	0.20	NEG	0.33	0.07	0.07	0.33
HEMOBA-1952	0.15	0.17	0.11	0.11	NEG	0.33	0.07	0.06	0.31
HEMOBA-1953	0.32	0.38	0.21	0.22	NEG	0.31	0.08	0.12	0.25
HEMOBA-1954	0.19	0.19	0.34	0.44	NEG	0.32	0.05	0.09	0.30
HEMOBA-1955	0.38	0.27	0.27	0.17	NEG	0.33	0.06	0.13	0.32
HEMOBA-1956	0.30	0.27	0.17	0.29	NEG	0.35	0.06	0.11	0.31
HEMOBA-1957	0.34	0.54	0.06	0.24	NEG	0.33	0.07	0.17	0.29
HEMOBA-1958	0.18	0.19	0.22	0.40	NEG	0.32	0.07	0.27	0.31
HEMOBA-1959	0.15	0.16	0.11	0.10	NEG	0.37	0.07	0.09	0.29
HEMOBA-1960	0.32	0.46	0.27	0.24	NEG	0.33	0.06	0.41	0.50
HEMOBA-1961	0.32	0.40	0.17	0.21	NEG	0.31	0.07	0.10	0.29
HEMOBA-1962	0.30	0.42	0.23	0.21	NEG	0.32	0.07	0.06	0.30

Código	IBMP-ELISA indireto (IR)				Teste de referência	IBMP-DAS-ELISA (IR)			
	IBMP					LCA	IBMP		
	8.1	8.2	8.3	8.4			8.1	8.2	8.3
HEMOBA-1964	0.45	0.36	0.23	0.25	NEG	0.43	0.29	0.18	0.29
HEMOBA-1965	0.53	0.52	0.05	0.30	NEG	0.31	0.07	0.24	0.21
HEMOBA-1966	0.22	0.33	0.20	0.17	NEG	0.32	0.07	0.06	0.22
HEMOBA-1967	0.30	0.37	0.22	0.20	NEG	0.61	0.11	0.48	0.26
HEMOBA-1968	0.36	0.37	0.24	0.19	NEG	0.32	0.07	0.35	0.22
HEMOBA-1969	0.36	0.37	0.23	0.14	NEG	0.31	0.07	0.06	0.23
HEMOBA-1970	0.31	0.35	0.30	0.34	NEG	0.32	0.07	0.06	0.23
HEMOBA-1971	0.35	0.29	0.27	0.19	NEG	0.31	0.07	0.07	0.22
HEMOBA-1972	0.37	0.33	0.19	0.34	NEG	0.33	0.48	0.35	0.23
HEMOBA-1973	0.32	0.39	0.18	0.19	NEG	0.31	0.07	0.10	0.26
HEMOBA-1974	0.14	0.17	0.07	0.12	NEG	0.31	0.08	0.06	0.23
HEMOBA-1975	0.19	0.23	0.08	0.10	NEG	0.32	0.06	0.05	0.23
HEMOBA-1976	0.19	0.24	0.15	0.12	NEG	0.34	0.08	0.09	0.24
HEMOBA-1977	0.24	0.23	0.18	0.08	NEG	0.32	0.08	0.07	0.22
HEMOBA-1978	0.16	0.27	0.13	0.10	NEG	0.32	0.08	0.36	0.39
HEMOBA-1979	0.15	0.25	0.08	0.14	NEG	0.32	0.07	0.30	0.23
HEMOBA-1980	0.27	0.23	0.10	0.13	NEG	0.34	0.09	0.06	0.22
HEMOBA-1981	0.16	0.17	0.09	0.10	NEG	0.42	0.07	0.97	0.27
HEMOBA-1982	0.29	0.23	0.08	0.09	NEG	0.33	0.07	0.13	0.22
HEMOBA-1983	0.22	0.16	0.13	0.17	NEG	0.33	0.07	0.07	0.23
HEMOBA-1984	0.22	0.22	0.12	0.10	NEG	0.31	0.06	0.24	0.24
HEMOBA-1985	0.23	0.33	0.26	0.23	NEG	0.33	0.07	1.13	0.56
HEMOBA-1986	0.17	0.25	0.22	0.11	NEG	0.36	0.07	0.11	0.23
HEMOBA-1987	0.11	0.16	0.19	0.07	NEG	0.33	0.06	0.10	0.23
HEMOBA-1988	0.38	0.22	0.08	0.29	NEG	0.46	0.07	0.05	0.24
HEMOBA-1989	0.24	0.25	0.09	0.13	NEG	0.24	0.08	0.09	0.29
HEMOBA-1990	0.28	0.26	0.15	0.12	NEG	0.28	0.06	0.07	0.23
HEMOBA-1991	0.33	0.18	0.23	0.24	NEG	0.23	0.06	0.56	0.22
HEMOBA-1992	0.16	0.15	0.11	0.10	NEG	0.26	0.07	0.06	0.23
HEMOBA-1993	0.19	0.19	0.06	0.08	NEG	0.24	0.08	0.06	0.22
HEMOBA-1994	0.03	0.13	0.11	0.07	NEG	0.24	0.08	0.12	0.24
HEMOBA-1995	0.14	0.25	0.13	0.11	NEG	0.23	0.06	0.31	0.20
HEMOBA-1996	0.28	0.25	0.20	0.22	NEG	0.26	0.07	1.02	0.23
HEMOBA-1997	0.13	0.16	0.08	0.08	NEG	0.26	0.07	0.44	0.27
HEMOBA-1998	0.20	0.35	0.09	0.12	NEG	0.21	0.06	0.10	0.22
HEMOBA-1999	0.13	0.19	0.05	0.13	NEG	0.25	0.06	0.17	0.28
HEMOBA-2000	0.14	0.29	0.07	0.08	NEG	0.25	0.06	0.11	0.22
HEMOBA-2001	0.20	0.22	0.13	0.79	NEG	0.24	0.07	0.13	0.23
HEMOBA-2002	0.12	0.21	0.08	0.08	NEG	0.24	0.07	0.09	0.25
HEMOBA-2003	0.11	0.24	0.05	0.08	NEG	0.25	0.06	0.11	0.23
HEMOBA-2004	0.14	0.15	0.09	0.09	NEG	0.24	0.08	0.50	0.23
HEMOBA-2005	0.18	0.16	0.09	0.15	NEG	0.31	0.07	2.57	0.24

Código	IBMP-ELISA indireto (IR)				Teste de referência	IBMP-DAS-ELISA (IR)			
	IBMP					LCA	IBMP		
	8.1	8.2	8.3	8.4			8.1	8.2	8.3
HEMOBA-2006	0.10	0.16	0.05	0.07	NEG	0.23	0.06	0.07	0.22
HEMOBA-2007	0.31	0.10	0.16	0.21	NEG	0.25	0.06	0.12	0.33
HEMOBA-2008	0.01	0.12	0.22	0.26	NEG	0.31	0.07	0.67	0.17
HEMOBA-2009	0.20	0.19	0.09	0.12	NEG	0.31	0.08	0.07	0.18
HEMOBA-2010	0.01	0.23	0.11	0.18	NEG	0.26	0.06	0.06	0.20
HEMOBA-2011	0.19	0.25	0.11	0.12	NEG	0.26	0.09	0.29	0.24
HEMOBA-2012	0.14	0.43	0.06	0.10	NEG	0.22	0.06	0.06	0.18
HEMOBA-2013	0.11	0.15	0.02	0.06	NEG	0.27	0.07	0.07	0.20
HEMOBA-2014	0.09	0.22	0.05	0.08	NEG	0.29	0.07	0.05	0.23
HEMOBA-2015	0.13	0.22	0.03	0.01	NEG	0.25	0.07	0.10	0.24
HEMOBA-2016	0.01	0.14	0.06	0.10	NEG	0.26	0.05	0.07	0.18
HEMOBA-2018	0.29	0.21	0.09	0.09	NEG	0.30	0.07	0.07	0.20
HEMOBA-2021	0.20	0.29	0.07	0.09	NEG	0.39	0.06	0.09	0.19
HEMOBA-2022	0.04	0.18	0.05	0.06	NEG	0.24	0.08	0.10	0.24
HEMOBA-2023	0.05	0.16	0.04	0.07	NEG	0.20	0.07	0.14	0.21
HEMOBA-2025	0.09	0.19	0.16	0.20	NEG	0.28	0.06	0.09	0.22
HEMOBA-2026	0.21	0.26	0.37	0.17	NEG	0.24	0.07	0.06	0.22
HEMOBA-2027	0.11	0.15	0.16	0.30	NEG	0.28	0.07	0.15	0.22
HEMOBA-2028	0.22	0.30	0.16	0.19	NEG	0.26	0.07	0.08	0.25
HEMOBA-2029	0.22	0.31	0.17	0.15	NEG	0.24	0.07	0.06	0.27
HEMOBA-2030	0.16	0.21	0.13	0.15	NEG	0.28	0.06	0.08	0.23
HEMOBA-2031	0.28	0.26	0.21	0.14	NEG	0.23	0.07	0.15	0.23
HEMOBA-2032	0.18	0.30	0.15	0.11	NEG	0.36	0.06	0.08	0.21
HEMOBA-2033	0.36	0.21	0.23	0.26	NEG	0.24	0.08	0.58	0.41
HEMOBA-2034	0.40	0.28	0.31	0.23	NEG	0.26	0.07	0.19	0.24
HEMOBA-2035	0.25	0.27	0.18	0.15	NEG	0.70	0.06	0.08	0.22
HEMOBA-2036	0.32	0.34	0.23	0.22	NEG	0.32	0.06	0.13	0.22
HEMOBA-2037	0.26	0.29	0.28	0.19	NEG	0.70	0.07	0.06	0.23
HEMOBA-2038	0.20	0.15	0.17	0.13	NEG	0.28	0.06	0.20	0.29
HEMOBA-2039	0.31	0.26	0.20	0.15	NEG	0.26	0.07	0.17	0.22
HEMOBA-2040	0.25	0.29	0.26	0.12	NEG	0.27	0.07	0.05	0.26
HEMOBA-2041	0.30	0.25	0.25	0.13	NEG	0.27	0.08	0.10	0.21
HEMOBA-2042	0.25	0.14	0.19	0.13	NEG	0.27	0.07	0.06	0.23
HEMOBA-2043	0.22	0.33	0.15	0.15	NEG	0.34	0.07	0.08	0.22
HEMOBA-2044	0.26	0.40	0.23	0.22	NEG	0.26	0.06	0.08	0.25
HEMOBA-2045	0.21	0.09	0.26	0.15	NEG	0.26	0.08	0.06	0.26
HEMOBA-2046	0.18	0.34	0.32	0.11	NEG	0.28	0.06	0.07	0.22
HEMOBA-2047	0.33	0.19	0.24	0.15	NEG	0.27	0.06	0.08	0.22
HEMOBA-2048	0.31	0.27	0.23	0.15	NEG	0.26	0.08	0.06	0.20
HEMOBA-2049	0.36	0.16	0.36	0.12	NEG	0.28	0.07	0.06	0.25
HEMOBA-2050	0.75	0.20	0.41	0.23	NEG	0.26	0.07	0.10	0.20
HEMOBA-2051	0.57	0.18	0.33	0.23	NEG	0.26	0.07	0.73	0.22

Código	IBMP-ELISA indireto (IR)				Teste de referência	IBMP-DAS-ELISA (IR)			
	IBMP					LCA	IBMP		
	8.1	8.2	8.3	8.4			8.1	8.2	8.3
HEMOBA-2052	0.39	0.24	0.39	0.26	NEG	0.26	0.06	0.08	0.20
HEMOBA-2054	0.29	0.17	0.46	0.15	NEG	0.27	0.10	0.11	0.12
HEMOBA-2056	0.28	0.19	0.20	0.10	NEG	0.31	0.07	0.09	0.11
HEMOBA-2057	0.20	0.23	0.17	0.18	NEG	0.29	0.07	0.13	0.11
HEMOBA-2058	0.18	0.17	0.16	0.14	NEG	0.26	0.08	0.08	0.13
HEMOBA-2059	0.20	0.19	0.14	0.13	NEG	0.30	0.06	0.08	0.11
HEMOBA-2060	0.15	0.19	0.12	0.14	NEG	0.26	0.07	0.32	0.11
HEMOBA-2062	0.12	0.19	0.11	0.10	NEG	0.26	0.14	0.14	0.11
HEMOBA-2063	0.26	0.46	0.20	0.20	NEG	0.28	0.08	0.09	0.11
HEMOBA-2064	0.18	0.24	0.15	0.20	NEG	0.26	0.07	0.08	0.10
HEMOBA-2065	0.19	0.26	0.15	0.14	NEG	0.27	0.06	0.07	0.11
HEMOBA-2067	0.20	0.24	0.12	0.11	NEG	0.27	0.06	0.07	0.11
HEMOBA-2068	0.14	0.17	0.11	0.11	NEG	0.25	0.07	0.47	0.12
HEMOBA-2069	0.16	0.18	0.12	0.15	NEG	0.26	0.06	0.15	0.15
HEMOBA-2070	0.17	0.21	0.15	0.14	NEG	0.26	0.06	0.09	0.11
HEMOBA-2071	0.09	0.16	0.08	0.14	NEG	0.32	0.06	0.08	0.12
HEMOBA-2072	0.22	0.25	0.14	0.17	NEG	0.27	0.07	0.07	0.10
HEMOBA-2073	0.17	0.24	0.11	0.12	NEG	0.28	0.06	0.10	0.10
HEMOBA-2074	0.17	0.22	0.14	0.17	NEG	0.27	0.06	0.08	0.12
HEMOBA-2075	0.20	0.26	0.19	0.17	NEG	0.29	0.07	0.08	0.11
HEMOBA-2076	0.21	0.21	0.16	0.17	NEG	0.26	0.07	0.29	0.11
HEMOBA-2077	0.24	0.29	0.19	0.18	NEG	0.29	0.06	0.40	0.11
HEMOBA-2078	0.10	0.15	0.09	0.10	NEG	0.27	0.06	0.24	0.12
HEMOBA-2079	0.27	0.32	0.17	0.19	NEG	0.27	0.07	0.14	0.11
HEMOBA-2080	0.18	0.22	0.11	0.13	NEG	0.27	0.07	0.07	0.11
HEMOBA-2081	0.13	0.15	0.09	0.09	NEG	0.27	0.07	0.07	0.11
HEMOBA-2082	0.17	0.19	0.10	0.18	NEG	0.39	0.07	0.17	0.16
HEMOBA-2083	0.24	0.16	0.09	0.21	NEG	0.58	0.07	0.07	0.12
HEMOBA-2084	0.11	0.12	0.05	0.08	NEG	0.28	0.07	0.15	0.12
HEMOBA-2085	0.16	0.12	0.10	0.12	NEG	0.28	0.06	0.19	0.10
HEMOBA-2087	0.20	0.28	0.14	0.17	NEG	0.28	0.07	0.12	0.11
HEMOBA-2089	0.21	0.19	0.14	0.17	NEG	0.24	0.07	0.17	0.11
HEMOBA-2090	0.23	0.20	0.08	0.18	NEG	0.22	0.07	0.22	0.11
HEMOBA-2091	0.25	0.25	0.19	0.23	NEG	0.41	0.11	0.65	0.21
HEMOBA-2093	0.26	0.29	0.21	0.18	NEG	0.26	0.06	0.08	0.12
HEMOBA-2094	0.24	0.28	0.23	0.23	NEG	0.26	0.07	0.27	0.12
HEMOBA-2096	0.15	0.15	0.10	0.10	NEG	0.24	0.07	0.09	0.13
HEMOBA-2097	0.15	0.17	0.09	0.13	NEG	0.31	0.07	0.09	0.13
HEMOBA-2099	0.20	0.19	0.12	0.12	NEG	0.28	0.07	0.08	0.15
HEMOBA-2100	0.18	0.21	0.15	0.15	NEG	0.29	0.07	0.07	0.13
HEMOBA-2101	0.20	0.26	0.14	0.14	NEG	0.28	0.06	0.12	0.16
HEMOBA-2102	0.10	0.17	0.11	0.10	NEG	0.32	0.07	0.09	0.19

Código	IBMP-ELISA indireto (IR)				Teste de referência	IBMP-DAS-ELISA (IR)			
	IBMP					LCA	IBMP		
	8.1	8.2	8.3	8.4			8.1	8.2	8.3
HEMOBA-2103	0.19	0.22	0.13	0.23	NEG	0.30	0.07	0.18	0.18
HEMOBA-2104	0.15	0.16	0.14	0.14	NEG	0.26	0.08	0.15	0.15
HEMOBA-2105	0.25	0.25	0.19	0.20	NEG	0.26	0.06	0.14	0.12
HEMOBA-2106	0.23	0.20	0.16	0.15	NEG	0.28	0.07	0.08	0.14
HEMOBA-2107	0.19	0.15	0.15	0.16	NEG	0.26	0.07	0.07	0.16
HEMOBA-2108	0.25	0.22	0.18	0.19	NEG	0.30	0.07	0.08	0.13
HEMOBA-2109	0.14	0.13	0.09	0.13	NEG	0.29	0.07	0.11	0.13
HEMOBA-2110	0.16	0.22	0.16	0.14	NEG	0.28	0.07	1.13	0.20
HEMOBA-2112	0.20	0.18	0.15	0.13	NEG	0.29	0.08	0.12	0.12
HEMOBA-2113	0.22	0.27	0.20	0.19	NEG	0.25	0.07	0.61	0.14
HEMOBA-2114	0.20	0.29	0.29	0.17	NEG	0.37	0.06	0.16	0.15
HEMOBA-2115	0.25	0.22	0.17	0.18	NEG	0.32	0.07	0.11	0.12
HEMOBA-2116	0.15	0.19	0.12	0.14	NEG	0.22	0.07	0.06	0.15
HEMOBA-2117	0.21	0.20	0.13	0.15	NEG	0.25	0.08	0.11	0.15
HEMOBA-2118	0.21	0.22	0.18	0.19	NEG	0.32	0.07	0.25	0.13
HEMOBA-2119	0.40	0.36	0.32	0.34	NEG	0.29	0.07	0.08	0.12
HEMOBA-2120	0.20	0.19	0.15	0.17	NEG	0.31	0.07	0.06	0.12
HEMOBA-2121	0.16	0.26	0.15	0.14	NEG	0.26	0.07	0.12	0.13
HEMOBA-2122	0.22	0.27	0.17	0.19	NEG	0.33	0.07	0.09	0.11
HEMOBA-3620	0.15	0.12	0.11	0.16	NEG	0.33	0.08	0.13	0.17
HEMOBA-3621	0.17	0.12	0.11	0.12	NEG	0.30	0.07	0.17	0.16
HEMOBA-3622	0.21	0.19	0.08	0.09	NEG	0.32	0.07	0.08	0.16
HEMOBA-3623	0.14	0.07	0.36	0.14	NEG	0.45	0.07	1.28	0.15
HEMOBA-3624	0.24	0.17	0.14	0.20	NEG	0.28	0.07	0.21	0.17
HEMOBA-3625	0.29	0.16	0.14	0.04	NEG	0.28	0.08	0.05	0.15
HEMOBA-3626	0.15	0.02	0.03	0.18	NEG	0.30	0.41	0.08	0.16
HEMOBA-3627	0.23	0.29	0.22	0.13	NEG	0.30	0.06	0.25	0.18
HEMOBA-3628	0.14	0.16	0.10	0.11	NEG	0.37	0.08	0.10	0.20
HEMOBA-3629	0.09	0.11	0.08	0.12	NEG	0.38	0.07	0.09	0.20
HEMOBA-3630	0.13	0.16	0.10	0.07	NEG	0.27	0.06	0.06	0.15
HEMOBA-3631	0.11	0.06	0.05	0.10	NEG	0.33	0.06	0.06	0.30
HEMOBA-3632	0.14	0.07	0.08	0.10	NEG	0.34	0.07	0.06	0.16
HEMOBA-3633	0.34	0.17	0.07	0.14	NEG	0.27	0.08	0.05	0.15
HEMOBA-3634	0.28	0.07	0.07	0.16	NEG	0.38	0.08	0.96	0.18
HEMOBA-3635	0.31	0.27	0.18	0.14	NEG	0.30	0.06	0.06	0.17
HEMOBA-3636	0.10	0.12	0.13	0.16	NEG	0.28	0.07	0.04	0.15
HEMOBA-3637	0.18	0.22	0.11	0.17	NEG	0.28	0.07	0.12	0.17
HEMOBA-3638	0.18	0.15	0.20	0.19	NEG	0.29	0.07	0.06	0.16
HEMOBA-3639	0.23	0.19	0.17	0.14	NEG	0.29	0.07	0.63	0.17

APÊNDICE B

Resultado das análises do IBMP-ELISA indireto e do IBMP-DAS-ELISA, estudo de reatividade cruzada

Código	Marcador sorológico	IBMP-DAS-ELISA (IR)			
		IBMP			
		8.1	8.2	8.3	8.4
HEMOBA-26	HBC	0.28	0.07	0.07	0.14
HEMOBA-27	HBC	0.28	0.07	0.05	0.14
HEMOBA-30	HBC	0.44	0.07	0.37	0.13
HEMOBA-31	HBC	0.31	0.09	0.06	0.19
HEMOBA-101	HBC	0.26	0.08	0.78	0.13
HEMOBA-105	HBC	0.33	0.08	1.01	0.14
HEMOBA-141	HBC	0.25	0.07	0.08	0.14
HEMOBA-144	HBC	0.32	0.05	0.13	0.30
HEMOBA-152	HBC	0.28	0.11	0.13	0.23
HEMOBA-157	HBC	0.23	0.08	0.06	0.32
HEMOBA-180	HBV	0.40	0.09	0.11	0.14
HEMOBA-181	HBV	0.22	0.04	0.14	0.22
HEMOBA-182	HBV	0.34	0.06	0.20	0.29
HEMOBA-183	HBV	0.25	0.05	0.99	0.17
HEMOBA-184	HBV	0.24	0.06	0.10	0.13
HEMOBA-187	HBV	0.24	0.07	0.13	0.16
HEMOBA-188	HBV	0.22	0.10	0.21	0.16
HEMOBA-189	HBV	0.42	0.17	0.12	0.14
HEMOBA-246	HBV	0.35	0.07	0.15	0.14
HEMOBA-367	HBV	0.24	0.07	0.07	0.20
HEMOBA-07	HCV	0.24	0.05	0.41	0.25
HEMOBA-109	HCV	0.24	0.06	0.84	0.15
HEMOBA-111	HCV	0.25	0.05	0.06	0.14
HEMOBA-234	HCV	0.25	0.10	0.08	0.17
HEMOBA-238	HCV	0.22	0.08	0.14	0.22
HEMOBA-240	HCV	0.29	0.09	0.10	0.14
HEMOBA-242	HCV	0.17	0.07	0.17	0.16
HEMOBA-283	HCV	0.25	0.08	0.13	0.17
HEMOBA-286	HCV	0.22	0.05	0.07	0.20
HEMOBA-287	HCV	0.38	0.06	0.12	0.13
HEMOBA-153	HIV-1/2	0.26	0.06	0.09	0.14
HEMOBA-156	HIV-1/2	0.20	0.11	0.16	0.14
HEMOBA-159	HIV-1/2	0.21	0.11	0.13	0.17
HEMOBA-160	HIV-1/2	0.27	0.05	0.20	0.14
HEMOBA-162	HIV-1/2	0.20	0.05	0.19	0.14

Código	Marcador sorológico	IBMP-DAS-ELISA (IR)			
		IBMP			
		8.1	8.2	8.3	8.4
HEMOBA-166	HIV-1/2	0.28	0.07	0.13	0.14
HEMOBA-272	HIV-1/2	0.23	0.05	0.32	0.13
HEMOBA-4177	HIV-1/2	0.21	0.08	0.54	0.15
HEMOBA-4264	HIV-1/2	0.22	0.05	0.09	0.14
HEMOBA-147	HTLV-1/2	0.24	0.05	1.07	0.17
HEMOBA-169	HTLV-1/2	0.29	0.05	0.07	0.14
HEMOBA-173	HTLV-1/2	0.49	0.06	0.13	0.17
HEMOBA-257	HTLV-1/2	0.21	0.06	0.15	0.26
HEMOBA-261	HTLV-1/2	0.21	0.05	0.13	0.16
HEMOBA-262	HTLV-1/2	0.20	0.06	0.92	0.26
HEMOBA-268	HTLV-1/2	0.22	0.08	0.08	0.17
HEMOBA-330	HTLV-1/2	0.21	0.06	0.11	0.17
HEMOBA-332	HTLV-1/2	0.39	0.05	0.69	0.23
SVLE-01-URFN	Leishmaniose visceral	0.24	-	-	0.21
VLE 04 (URFN)	Leishmaniose visceral	0.22	-	-	0.23
VLE 05 (URFN)	Leishmaniose visceral	0.78	-	-	0.33
SVLE 09 (URFN)	Leishmaniose visceral	0.22	-	-	0.21
SVLE 10 (URFN)	Leishmaniose visceral	0.23	-	-	0.17
SVLE 11 (URFN)	Leishmaniose visceral	0.23	-	-	0.16
SVLE 22 (URFN)	Leishmaniose visceral	0.20	-	-	0.16
SVLE 35 (URFN)	Leishmaniose visceral	0.22	-	-	0.18
SVLE 44 (URFN)	Leishmaniose visceral	0.21	-	-	0.27
VLC 56 (URFN)	Leishmaniose visceral	0.24	-	-	0.26
HEMOBA-4091	Sífilis	0.23	0.06	0.12	0.28
HEMOBA-4102	Sífilis	0.23	0.05	0.33	0.17
HEMOBA-4105	Sífilis	0.22	0.06	0.10	0.20
HEMOBA-4107	Sífilis	0.20	0.05	0.07	0.17
HEMOBA-4117	Sífilis	0.22	0.06	0.09	0.16
HEMOBA-4126	Sífilis	0.18	0.08	0.08	0.18
HEMOBA-4130	Sífilis	0.22	0.07	0.63	0.31
HEMOBA-4156	Sífilis	0.22	0.06	0.12	0.23
HEMOBA-4162	Sífilis	0.23	0.06	0.09	0.16
HEMOBA-4170	Sífilis	0.21	0.13	0.08	0.16