



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGÊNICA DE EXTRATOS COMBINADOS DE
TRYPANOSOMA CRUZI TCI E TCIV CIRCULANTES NA REGIÃO AMAZÔNICA**

SABRINA SILVA DE BRITO

MANAUS

2020



SABRINA SILVA DE BRITO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGÊNICA DE EXTRATOS COMBINADOS DE
TRYPANOSOMA CRUZI TCI E TCIV CIRCULANTES NA REGIÃO AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

Co-orientador: Prof^o Dr^o. Adriano Gomes da Silva

MANAUS

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

S118a Brito, Sabrina Silva de

Avaliação da atividade antigênica de extratos combinados de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV circulantes na região amazônica / Sabrina Silva de Brito. Manaus: [s.n], 2020.
61f.: color,; 29cm.

Dissertação – Pós-Graduação em Medicina Tropical - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020.

Inclui bibliografia

Orientador: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

Coorientador: Adriano Gomes da Silva

1. Doença de Chagas. 2. ELISA *in house*. 3. Linhagens TcI e TcIV. 4. Amazonas
I. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra (Orient.). II. Adriano Gomes da Silva (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Avaliação da atividade antigênica de extratos combinados de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV circulantes na região amazônica

Elaborado por Jeane Macelino Galves – CRB-11/463

FOLHA DE JULGAMENTO**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGÊNICA DE EXTRATOS
COMBINADOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* TCI E TCIV
CIRCULANTES NA REGIÃO AMAZÔNICA****SABRINA SILVA DE BRITO**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

Prof.^a Dr.^a Leíla Inês de Aguiar Raposo da Câmara Coelho

Prof.^o Dr.^o Jorge Augusto de Oliveira Guerra

DEDICATÓRIA

Dedico à memória de meu amado e saudoso pai, Ercules Batista da Silva, homem bondoso, cristão, bom filho, bom esposo, bom pai e maravilhoso avô, que com muita luta conseguiu dar a melhor educação para que os filhos estivessem sempre no caminho dos estudos e sucesso profissional.

Dedico a minha mãe, Sumaia Oliveira da Silva e Silva, mulher exemplar, que sempre inspirou caráter e nunca mediu esforços para que seus filhos tivessem a melhor educação. Apoiadora de todo meu sucesso profissional.

Ao meu irmão, Ercules Batista da Silva Filho, que sempre vibra com minhas maiores conquistas.

Dedico ao meu esposo Wisley Fernando Pinto de Brito, homem sábio, dedicado, meu incentivador e maior apoiador de todas as decisões em minha vida. Com todo seu zelo e amor dedicados a mim e nosso filho a caminhada foi menos árdua.

Ao meu filho, Pedro Emanuel Silva de Brito, motivo do meu esforço, que desde a morada em meu ventre colaborou para que eu pudesse chegar na fase final de mais um estudo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao criador do mundo, Deus, e minha Mãe protetora, Nossa Senhora das Graças, quem sempre passa na frente abrindo os melhores caminhos. Sem a presença Deles, nada seria possível.

A minha amada família, pelas vibrações e apoio constante a cada conquista. Aos meus pais, por toda dedicação e esforço para que eu tivesse a melhor educação. Ao meu irmão, pelo orgulho e amor que sente por mim. Aos meus sogros, pelas orações, carinho e amor doados a mim. Ao meu esposo, por ser meu incentivador e maior apoiador das decisões tomadas. Obrigada pelas inúmeras vezes que assistiu minhas apresentações e ouviu minhas explicações. Você é o engenheiro de telecomunicação que mais entende de doença de Chagas. Ao meu filho, minha maior riqueza, que desde tão pequeno travou tantas batalhas junto a mim, e mesmo assim, conseguiu colaborar para que eu chegasse na conclusão do mestrado.

A minha tia, Dra. Eva Batista da Silva, a quem eu me espelhei para seguir os passos nessa vida de pesquisadora e docente. Obrigada por ter visto em mim, aos 17 anos o potencial em ser farmacêutica bioquímica. Obrigada por ter me inserido na FMT e ter aberto um mundo de oportunidades na pesquisa.

Aos amigos que entenderam a ausência em muitos momentos festivos por conta da dedicação ao mestrado.

A minha orientadora, a “temida” e amada Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, que não desistiu de mim como aluna, mesmo eu reprovando duas vezes na seleção do mestrado. Minha admiração pelo seu perfil profissional vem desde 2008, na minha primeira apresentação de PAIC, quando todos temiam a sua avaliação, e eu ouvia atenta a cada correção e pensava, quero ser igual a ela. Que Deus guarde sua vida Dra. Minha eterna gratidão por todos ensinamentos.

Ao meu co-orientador, Dr. Adriano Gomes da Silva, pela disponibilidade de tempo e contribuições sempre relevantes na pesquisa.

Ao meu amigo MSc. Edson Fidelis, quem abriu novamente as portas da FMT, me incentivando e me ajudando nos estudos para seleção.

A todos os integrantes e colaboradores do grupo de pesquisa em doença de Chagas Dr. João Macias Frade e ao grupo de Leishmaniose, pela receptividade e inúmeras contribuições. Em especial Dr. Jorge Guerra, Dra. Katia Couceiro e Dra. Alba Brandão.

Aos funcionários do Laboratório de Entomologia, Auxiliadora Chiarion, Flávio Fé, Silvia Justiniano, Grafe Pontes e especial ao Sr. Nelson Fé e Sra. Yolanda Noguth pelo tempo e ensinamentos disponibilizados.

Aos amigos mais chegados e colegas de bancada, Susan (menina), gratidão pelos ensinamentos e paciência. Se não tivéssemos diferenças não ia dar tão certo, as diferenças nos fizeram uma dupla quase perfeita. Matheus e Emily, obrigada pela ajuda e companhia nas infinitas horas no ELISA. Débora Raysa, Jéssica Ortiz e Arinéia Soares obrigada minhas amigas pelo companheirismo, carinho e toda ajuda cedida. Evelyn Vaz, Rubens Andrade, Kenny Rodrigues, Lucas Ferreira, Suzan Simões, Gabriela Maciel e Claudia Reis, obrigada pelos momentos de descontração em nossas inúmeras comemorações.

Aos meus colegas da melhor turma que o PPGMT teve. Meus queridos a frase “Nenhum homem é uma ilha” faz total sentido para nós. Gratidão pelos anos juntos e em harmonia.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade do Estado do Amazonas por oportunizar meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

À Fundação de Medicina Tropical- HVD pela estrutura para execução do projeto de dissertação.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pelos ensinamentos transmitidos. As secretárias Iza Freitas e Conceição Tufic por todo apoio, paciência e dedicação aos alunos.

A todos, minha imensa gratidão.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Os dados desta pesquisa tiveram o apoio financeiro da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM. O projeto faz parte de um projeto maior sob título “DESENVOLVIMENTO IN HOUSE DE TESTE IMUNOLÓGICO, PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA, UTILIZANDO LINHAGENS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* CIRCULANTES NO ESTADO DO AMAZONAS”, coordenado pela Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário que causa a Doença de Chagas (DC) e o diagnóstico de escolha é feito com base nas fases clínicas da infecção, recomendando-se métodos parasitológicos (esfregaço e gota espessa) onde o parasito é visualizado, na fase aguda (DCA), e métodos imunológicos, detectando-se anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em pelo menos dois testes reagentes na fase crônica (DCC). Os Kits comerciais usam extratos de *T. cruzi* circulante em áreas endêmicas levando muitas vezes a resultados inconclusivos, e discordantes nas diferentes populações. Nesse sentido é importante o desenvolvimento de testes sorológicos usando também as linhagens de áreas não endêmicas onde o ciclo do parasito é primariamente silvestre. O objetivo deste trabalho foi investigar a sensibilidade e especificidade de extratos de antígenos combinados obtidos de isolados de *T. cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas em soros de pacientes com diagnóstico para doença de Chagas. Foram testadas 7 combinações de extratos de isolados de humanos com a DCA e vetor, procedentes de 4 municípios do Amazonas. A média entre as densidades óticas das combinações dos extratos de antígenos em todos os grupos de soros dos pacientes, apresentou diferença significativa $p < 0.0001$. Ao comparar os valores obtidos dos extratos totais, observou-se 0.89 na área da curva ROC e 95% e 84% de sensibilidade e especificidade respectivamente na combinação do isolado de *T. cruzi* TcI obtido de *Rhodnius robustus*. Observou-se também 0.87 na área da curva ROC e 89% e 81% de sensibilidade e especificidade respectivamente na combinação do isolado de *T. cruzi* TcIV obtido de humanos com a DCA por transmissão oral. Foi observado ainda que quando inseridos os soros de pacientes com histórico de leishmaniose, a especificidade e sensibilidade do teste baixou, diminuindo assim as áreas das curvas ROC em todas as combinações testadas.

Palavras chaves: Doença de Chagas, ELISA *in House*, Linhagens TcI e TcIV, Amazonas

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a protozoan that causes Chagas Disease (CD) and the diagnosis is based on two clinical stages of the infection, recommending parasitological methods (smear and thick drop) in the acute phase (DCA), where the parasite is visualized, and immunological methods, in the chronic phase (DCC) by detecting IgG anti-*T.cruzi* antibodies in at least two reagent tests. The commercial kits use extracts of *T. cruzi* circulating in endemic areas, often leading to inconclusive results, and discordant in different populations. In this sense, it is important to develop serological tests also using lineages from non-endemic areas where the parasite cycle is primarily wild. The objective of this work was to investigate the sensitivity and specificity of extracts of combined antigens obtained from isolates of *T. cruzi* TcI and TcIV circulating in Amazonas in sera of patients diagnosed with Chagas disease. Seven combinations of extracts from human and vector isolates were tested, from 4 municipalities in Amazonas. The mean between the optical densities of the combinations of the extracts of antigens in all the groups of sera of the patients, presented significant difference $p < 0.0001$. When comparing the values obtained from the total extracts, 0.89 was observed in the area of the ROC curve and 95% and 84% sensitivity and specificity respectively in the combination of the *T.cruzi* TcI isolate obtained from *Rhodnius robustus*. It was also observed 0.87 in the area of the ROC curve and 89% and 81% of sensitivity and specificity respectively in the combination of the *T. cruzi* TcIV isolate obtained from acute CD humans. It was also observed that when the sera of patients with a history of leishmaniasis were inserted, the specificity and sensitivity of the test decreased, thus reducing the areas of the ROC curves in all tested combinations.

Key words: Chagas disease, ELISA *in House*, TcI and TcIV strains, Amazonas

RESUMO LEIGO

A Doença de Chagas (DC) acomete pessoas de todas idades em duas fases, uma aguda (período inicial) e a crônica (fase tardia). Na fase aguda a doença é identificada através do exame gota espessa o mesmo exame para malária, na fase crônica o método recomendado é o sorológico, que busca identificar anticorpos. Esse parasito circula em diferentes espécies de animais além do homem e entre diferentes espécies de insetos conhecidos como barbeiros, sofrendo modificações durante a mudança de hospedeiros. No diagnóstico sorológico os testes mostram resultados confusos. Neste trabalho foram testadas combinações de protozoários isolados de pacientes com a doença aguda e de triatomíneos para o diagnóstico sorológico realizado em laboratório. Foi observado que combinando extratos de parasitos os testes tiveram melhor resultado. Foi observado também que as amostras dos pacientes que tinham histórico de leishmaniose, foram positivas, o que indica a possibilidade de uma reatividade cruzada.

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Casos da Doença de chagas reportados pela OMS.....1
- Figura 2.** Ciclo de vida de *T. cruzi*.....2
- Figura 3.** Distribuição geográfica das diferentes DTU's de *T. cruzi*.....3
- Figura 4.** Mapa dos municípios com reporte de surtos.....10

MANUSCRITO

- Figura 1.** Curva ROC da combinação AM61 T2 + T5. **A1.** Soros positivos x negativos. Área 0.89. Sensibilidade 95% e especificidade 84%, num cut-off de 765. **A2.** Soros positivos x negativos e leishmaniose. Área 0.82. Sensibilidade 78% e especificidade 73%, num *cut-off* de 83121

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1 - Isolados utilizados para as combinações de antígenos.....	15
Tabela 2 - Extratos de antígenos obtidos da região amazônica.....	17
Tabela 3 - Combinações de extratos de antígenos.....	18
Tabela 4. Médias das densidades óticas dos soros na testagem com a combinação de antígenos.....	18
Tabela 5. Valores das análises obtidos das combinações de antígenos pela curva ROC.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

µg: microgramo
µl: microlitro
°C: grau Celsius
ROC: Receiver Operating Characteristic (Característica de Operação de Receptor)
DCA: Doença de Chagas aguda
DCC: Doença de Chagas crônica
DTU: Unidades Discretas de Tipagem
ELISA: Ensaio imunoenzimático
HAI: Hemaglutinação indireta
HCl: Ácido clorídrico
ID: Identificação
IgM: Imunoglobulina M
IgG: Imunoglobulina G
IFI: Imunofluorescência indireta
LEISH: Amostra de leishmaniose
ml: mililitro
N: Normal
NEG: Amostra negativa
nm: nanômetros
OMS: Organização Mundial da Saúde
OPD: O-Fenilenediamina
PBS: buffer de fosfato
PCR: Reação em cadeia da polimerase
POS: Amostra positiva
SFB: Soro fetal bovino
WB: Western blot

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.2. <i>Agente etiológico</i>	2
1.3. <i>Classificação do Trypanosoma cruzi</i>	3
1.4. <i>Vetor – Hospedeiro invertebrado</i>	4
1.5. <i>Reservatório – Hospedeiro vertebrado</i>	4
1.6. <i>Formas de transmissão</i>	5
1.7. <i>Aspectos clínicos</i>	5
1.8. <i>Diagnóstico</i>	6
1.9. <i>Doença de Chagas na Amazônia</i>	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. <i>Geral</i>	11
2.2. <i>Específico</i>	11
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO-MANUSCRITO	12
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS	26
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS	28
7. ANEXOS	35
7.1. <i>POP: Procedimento para preparação de 1L de PBS 20x</i>	35
7.2. <i>POP: Procedimento da preparação do Tampão de bloqueio para o uso em ELISA</i>	37
7.3. <i>POP: Procedimento da preparação de Tampão de carbonato para o uso em ELISA</i>	39
7.4. <i>POP: Procedimento da preparação do Tampão de lavado para o uso em ELISA</i>	41
7.5. <i>POP: Procedimento da preparação do Tampão do OPD para o uso em ELISA</i>	43
7.6. <i>Parecer ético</i>	45

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas é uma parasitose originária do continente americano, causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Descoberta há mais de 100 anos é considerada negligenciada, e problemas de saúde pública de grande impacto socioeconômico (1,4,5,6).

1.1. Epidemiologia

Considerada uma doença da América Latina, nas últimas décadas tem se dispersado, para os Estados Unidos, Canadá e outros continentes, principalmente o europeu e asiático através do movimento migratório de pessoas infectadas (Figura 1). Estima-se que haja no mundo entre 6-7 milhões de pessoas infectadas, sendo aproximadamente 1,6 milhões no Brasil. Estima-se que no mundo tem 25 milhões de pessoas em risco de infecção, causando mais de 7000 mortes por ano (1).

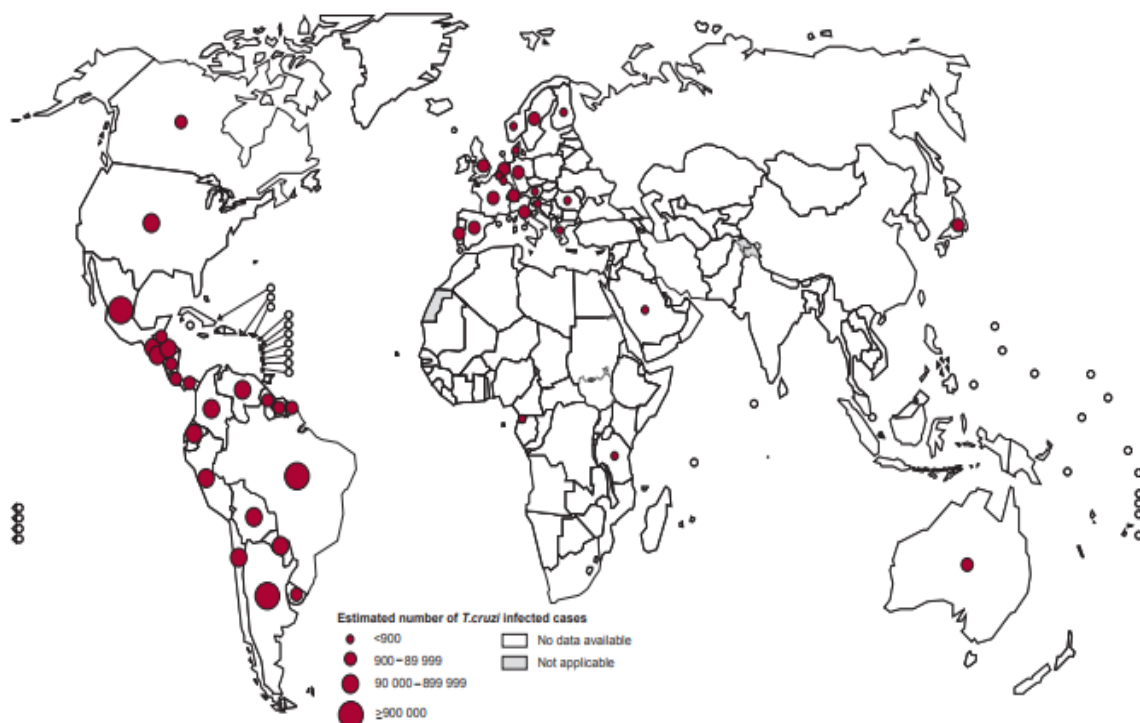


Figura 1. Casos da Doença de chagas reportados pela OMS (Fonte: WHO).

1.2. Agente etiológico

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado de ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Schizotrypanum*. É caracterizado por possuir um único flagelo e o cinetoplasto que possui volume demasiado excedente dos limites da membrana parasitária, sendo este uma organela que contém DNA e localiza-se na mitocôndria. Se apresenta em três formas evolutivas, identificadas morfologicamente pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo celular e pelo surgimento do flagelo, sendo elas: amastigotas (intracelular e reprodutiva), epimastigotas e tripomastigotas. É um parasito heteróxico, que apresenta um ciclo complexo em diferentes hospedeiros vertebrados e invertebrados (Fig. 2) (8,9,13,25).

Para se adaptar aos diferentes microambientes dentro de seus hospedeiros, o *T. cruzi* sofre modificações biológicas que causam diferenciação em suas estruturas e metabolismo, viabilizando a infecção. Os animais hospedeiros do ciclo do parasito incluem um mamífero e um hematófago onde atua como um vetor principal que pertence à ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae* (13,25).

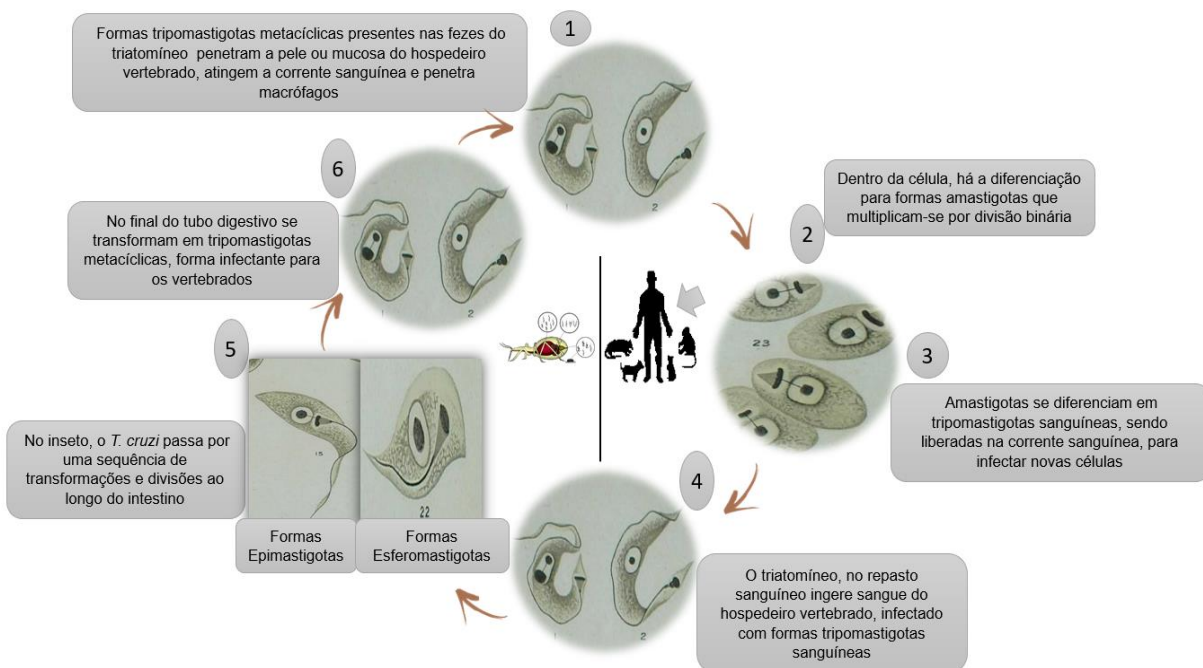


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Fonte: Sousa, DRTS, 2018, adaptado

1.3. Classificação do *Trypanosoma cruzi*

Por ser um parasito de ampla distribuição geográfica, e ter um ciclo de vida complexo, diferentes formas morfológicas e diferentes hospedeiros, o *T. cruzi* possui diversidade genética. Ao longo do tempo, foram propostas diferentes classificações (21).

Em 1974 foi proposta a primeira classificação tendo como parâmetros as lesões histopatológicas das fases aguda e crônica da DC, denominado de “biodemas”. Posteriormente, as diferenças isoenzimáticas o classificaram em zimodemas. A classificação atual tem como base características genotípicas e foi apresentada em 2009, dividindo-o em grupos chamados unidades de tipagem discreta (DTU: Discrete Typing Units), de Tc I até Tc VI e TcBat levando em consideração aspectos eco-epidemiológicos e patogenicidade. Pode se observar a distribuição das DTU em diferentes regiões como mostra a Figura 3. (21–23, 65).

No Amazonas, tem se reportado as linhagens TcI, TcIII e Tc IV, nos casos agudos, TcIV relacionado ao consumo alimentos contaminados, principalmente o suco do açaí, e TcI em casos crônicos (16,26–29).

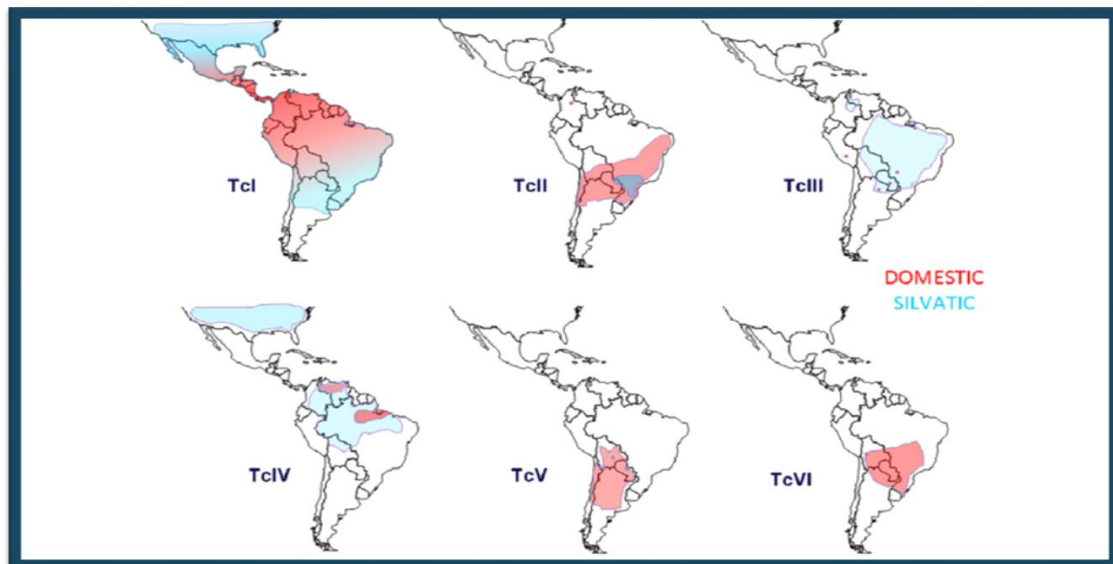


Figura 3. Distribuição geográfica das diferentes DTU's de *T. cruzi*.

Fonte: Zingales (21)

1.4. Vetor – Hospedeiro invertebrado

Os triatomíneos ou “barbeiros” são insetos da ordem Hemiptera, Família Reduviidae, subfamília Triatomine agrupados em 18 gêneros, com aproximadamente 140 espécies, onde estão aquelas consideradas vetores da doença de Chagas, *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são os gêneros de maior importância médica (14,15). No Brasil foram encontradas 62 espécies, dentre as quais pelo menos 10 são consideradas vetores sendo as espécies vetores predominantes *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus* e *Panstrongylus geniculatus* (16,17)

O ciclo de vida do barbeiro começa com um estágio de ovo e passa por 5 fases ninfais até a fase adulta, todos estritamente hematófagos, necessitando do sangue para evolução em seu desenvolvimento nos diferentes estágios e oviposição da fêmea. Durante a hematofagia podem se alimentar de sangue de mamíferos que podem atuar como hospedeiros ou reservatórios do *T. cruzi* (10–12).

1.5. Reservatório – Hospedeiro vertebrado

A principal forma de transmissão do *T. cruzi* ao homem é a vetorial, e nesse contato inicial a forma tripomastigota metacíclico, é a forma circulante e infectante, eliminada pelas fezes ou urina do triatomíneo (13).

Tanto o homem como outros mamíferos são importantes para o ciclo do *T. cruzi*. Os mamíferos servem de reservatório mantendo assim a dispersão do *T. cruzi* e conseqüentemente da doença. Tem sido encontrado aproximadamente 180 espécies de mamíferos infectados com *T. cruzi*, os quais pertencem as ordens: Didelphimorphia, Lagomorpha, Chiroptera, Rodentia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata, Perisodactyla (18,19).

Há descrições que a espécie *Didelphis marsupialis* além de atuar como reservatório, também atua como vetor, devido às formas flageladas do parasita que tem sido encontrada nas glândulas anais de alguns animais coletados, permitindo assim a liberação de fluídos contaminados e facilitando a dispersão do parasito (18).

No Amazonas, tem sido descrito a presença de marsupiais infectados com *T. cruzi* (20)

1.6. Formas de transmissão

A forma clássica de transmissão da doença de Chagas para o homem, nas áreas endêmicas, é a vetorial, isso ocorre porque há domiciliação de triatomíneos. No entanto, outras formas de transmissão também podem acontecer: a congênita, a transfusão ou transplante, acidentes laboratoriais e a oral que é mais comum no ciclo silvestre uma vez que animais vertebrados podem se alimentar de barbeiros infectados com o *T. cruzi* (30).

A transmissão oral para o homem, pode ocorrer quando algum alimento ou bebida contaminado é ingerido. No Brasil e em outros países como Colômbia e Venezuela tem sido reportado surtos pelo consumo de sucos de frutas regionais contaminados (31,32). Entre os anos 2005 e 2013 o Ministério da Saúde reportou 112 surtos no Brasil, predominantemente na região norte com 91% dos casos totais, por transmissão oral (16,33).

1.7. Aspectos clínicos

Após a infecção a doença de Chagas pode ou não, se manifestar sintomaticamente, em duas fases clínicas, a fase inicial em que se apresenta alta parasitemia, chamada de fase aguda e a fase crônica indeterminada que se apresenta com baixa parasitemia, sendo observadas manifestações clínicas tardiamente (34).

A transmissão vetorial tem um período de incubação de 4-15 dias, a oral de 3-22 dias e na transfusão de sangue tem um período de 30-40 dias. A doença de Chagas aguda (DCA) pode durar de 3-8 semanas, depois dessa fase, entra na crônica (DCC), a qual pode durar entre 15-20 anos ou pela vida toda (35).

Na fase aguda sintomática, pode se observar, febre, cefaléia, mialgias, astenia, edema, rash cutâneo, adenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, ascite, linfadenopatia, taquicardia e em casos muito graves pode se apresentar até

meningoencefalite; no caso da transmissão vetorial pode apresentar sinal de Romaña ou chagoma (35–38).

Na fase crônica a DC pode ser indeterminada se não apresentar sintomas nem comprometimento cardíaco, observado pelas alterações no eletrocardiograma e nas radiografias do coração, esôfago ou cólon. No entanto, é possível serem detectados anticorpos IgG específicos para *T. cruzi* o que representa infecção pregressa. A instalação de DCC é caracterizada pelas alterações cardíacas e/ou digestivas como cardiomegalia, megaesôfago e megacólon, aproximadamente entre o 20-30% dos crônicos desenvolve a forma cardíaca, apresentando arritmias, insuficiência cardíaca e fenômenos tromboembólicos. A forma digestiva apresenta dilatações patológicas do esôfago e cólon (14,15,34,35,5).

1.8. Diagnóstico laboratorial

Para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas é importante saber em qual fase da doença o paciente se encontra, para recomendação do método diagnóstico (24).

Na DCA a parasitemia é alta, recomendando-se exames parasitológicos, através da coleta e observação de formas tripomastigotas no sangue. A gota espessa e o esfregaço, são os métodos utilizados. O método sorológico é usado como exame complementar. Na fase aguda, detecta-se os anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM (35,52).

Na DCC, devido a baixa parasitemia o método recomendado é o sorológico, e para que um diagnóstico laboratorial seja considerado positivo é preciso realizar e haver reatividade em pelo menos dois testes sorológicos de princípios diferentes. Nessa fase os anticorpos detectados são anti-*T. cruzi* classe IgG, e os métodos recomendados são Imunofluorescência Indireta (IFI), a Hemoaglutinação (HAI) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). Quando se tem resultado discordante, um teste reagente e outro não reagente, é preciso do uso de um terceiro teste que seja mais específico, como o por exemplo o Western Blot (34,35,52–54).

Segundo a OMS, o teste sorológico ideal deveria ser fácil de executar, rápido, barato, que não necessite de equipamentos ou refrigeração de reagentes e que apresente uma sensibilidade e especificidade de 100%. No entanto, os testes para doença de Chagas não apresentam tais características, sendo necessário pelo menos dois testes reagentes para fazer o diagnóstico laboratorial (52,66).

Os testes sorológicos podem ser classificados como convencionais e não convencionais, sendo os convencionais aquele que usa antígenos do parasito total ou parcial, e os não convencionais quando é usado proteínas recombinantes, purificados ou peptídeos sintéticos. Cada teste tem diferente princípio e já tem sido descrito a possibilidade de serem discordantes uns com os outros. Essas discrepâncias se devem a diferentes fatores, uma das principais é a reatividade cruzada que o *T. cruzi* apresenta com outros parasitos, principalmente o da Leishmaniose, sendo esse fator um dos mais descritos pelos autores quando testam metodologias que usam antígenos totais. Outros fatores que podem influenciar nos resultados discordantes são a preparação do antígeno e o estágio do parasito quando é feita a obtenção do antígeno (52,55–60).

A técnica de ELISA- *in house* é muito recomendado, já que os testes comerciais utilizam linhagens que na maioria das vezes, não é a mesma que se encontra na região onde são aplicados os testes. Pelo motivo que a utilização de antígenos preparados com linhagens autóctones incrementa a sensibilidade do diagnóstico. Além disso, a diferença das linhagens encontradas nas Américas pode influir na variabilidade da resposta imunitária dos indivíduos infectados (55,58,60,3,61–63).

1.8.1 Enzyme Linked Immunoassorbent assay (ELISA)

Os imunoenaios são testes que utilizam como reagente os anticorpos, onde o desenvolvimento se deu no ano de 1960 com o método de radioimunoensaio. Baseado nessa técnica, foram desenvolvidos outros métodos, como a técnica de ELISA, a qual utiliza enzimas como: peroxidase, fosfatase alcalina, entre outras, ligadas a um dos reagentes para assim realizar a quantificação no momento de adicionar o substrato ou cromógeno que vai reagir com a enzima. O ELISA possui três metodologias principais, o direto, indireto e o sanduíche (67,68).

O ELISA indireto, de forma geral, funciona quando se põe o antígeno em uma fase sólida, onde consegue se aderir a superfície pela incubação. Em cada passo são realizadas lavagens para excluir tudo o que não esteja aderido nesse sistema sólido. Posteriormente são incubados os anticorpos que estão presentes nos soros dos pacientes e em caso de ter anticorpos específicos para o antígeno, vão se ligar. Quando contrário, no momento da lavagem, eles vão ser descartados e posteriormente é adicionado ao anti-anticorpo que se unem aos anticorpos presentes na reação antígeno-anticorpo. Esse anti-anticorpo vai estar marcado com uma enzima, a qual vai reagir com o substrato que será adicionado posteriormente, gerando uma reação colorimétrica que pode ser medido pelo espectrofotômetro. A vantagem desse sistema é que o anti-anticorpo não é específico para um só antígeno e sim para a espécie do anticorpo, sendo altamente usado no diagnóstico quando se trabalha com muitas amostras. Entretanto, o sistema apresenta desvantagem de grau variável de uniões não específicas, isso tende a alargar a variabilidade dos resultados no ensaio. (68)

Para a validação de um teste os primeiros parâmetros precisos são a sensibilidade e a especificidade diagnóstica. A sensibilidade diagnóstica é a proporção de pacientes de referência infectados, são os positivos no ensaio. Os pacientes infectados que estão com teste negativo são considerados como falsos negativos, tendo que a sensibilidade é a probabilidade de que um paciente verdadeiramente infectado seja positivo no teste. De outro lado, a especificidade diagnóstica é a proporção de pacientes de referência não infectados, são os negativos no ensaio. Os pacientes não infectados e com teste positivo são considerados como falsos positivos, tendo que a especificidade é a probabilidade de um paciente verdadeiramente sadio ter um resultado negativo no teste (68,69).

Quando se obtém os parâmetros de verdadeiros positivos e negativos, os valores preditivos podem ser calculados. Onde valor preditivo positivo é a porcentagem de pacientes que verdadeiramente tem a doença e que foram avaliados pelo teste como positivos e o valor preditivo negativo é a porcentagem de pacientes verdadeiramente sadios, sem a doença, e que no teste foram negativos (68).

Os parâmetros de sensibilidade e especificidade podem ser avaliados com a curva Receiver Operating Characteristics (ROC). A análise ROC funciona avaliando o desempenho do sistema em termos de Se(sensibilidade) e $1 - Sp$ (especificidade) para cada valor observado da variável discriminadora, assumida como um limite de decisão. No caso da ELISA, que produz valores contínuos, o valor de *cut-off* pode ser deslocado ao longo de uma faixa de valores observados, e Se e $1 - Sp$ são estabelecidos para cada um deles. Isso significa, que o curva ROC permite a análise de diferentes pontos (68,70).

O gráfico da curva ROC de ensaios diagnósticos que consegue distinguir entre as amostras positivas e negativas de referência passa a coordenada (0;1), o que é equivalente a $Se=Sp=100\%$, isso daria como resultado uma área de 1.0 da curva ROC, e o estudo da área abaixo da curva (AUC), a qual avalia as probabilidade de $(1 - Sp)$ e Se, é a característica estatística mais importantes que gera a curva ROC (68).

1.9. Doença de Chagas na Amazônia

A Amazônia brasileira foi considerada por muito tempo como uma região sem registro da doença de Chagas. Os primeiros quatro casos de doença de Chagas aguda foram registrados em 1966 em Belém, Pará, com suspeita de transmissão oral, devido à ausência de triatomíneos na residência (39).

Doença de Chagas no Amazonas

No Amazonas, os primeiros casos detectados da doença de Chagas foram na fase crônica em 1977 no município de Barcelos utilizando o método sorológico, já no ano 1979 foi encontrado o primeiro caso da doença de Chagas aguda no município de São Paulo de Olivença (40,41).

No ano de 2004, registrou-se o primeiro surto da DC aguda, pela transmissão oral, no município de Tefé com nove casos. A partir de então mais sete surtos, foram notificados (Fig. 4) (16,27,42,43).

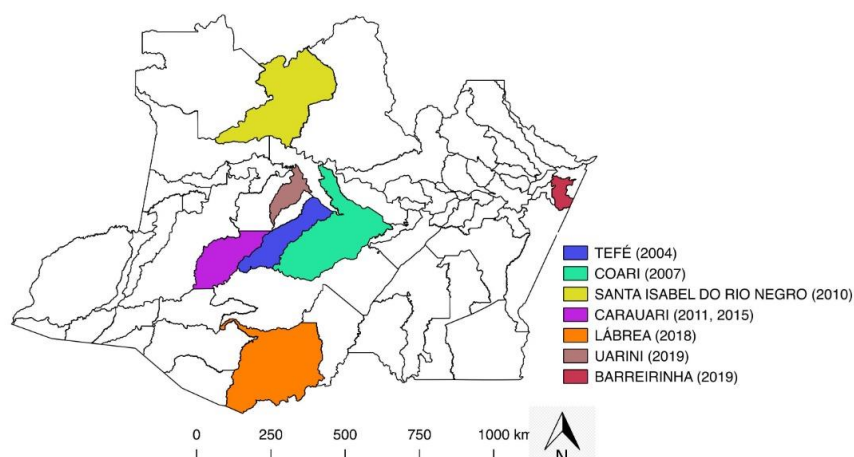


Figura 4. Mapa dos municípios com reporte de surtos.

Fonte: Ortiz, 2019.

Casos agudos isolados, também tem sido detectado, pelos microscopistas da vigilância em malária, bem como casos crônicos a partir de triagem para doação de sangue, ambulatórios de doença cardíaca e inquéritos sorológicos realizados na região (16,28,44–51).

Estima-se uma frequência de 1,9% na população estudada; os triatomíneos vetores apresentaram uma taxa de infecção natural de 30-50% e os reservatórios silvestres de 50-70% (16,20,46).

Nos inquéritos sorológicos realizados no Amazonas tem se encontrado divergências nos resultados dos kits comerciais usados, dificultando o diagnóstico da doença de Chagas crônica. Os testes comerciais disponíveis no mercado são produzidos usando linhagens TcII, TcV ou TcVI, os quais são linhagens ainda não descritos no Amazonas e isso pode afetar na sensibilidade e especificidade destes testes. (16,48,55,64)

Devido aos resultados discordantes dos testes sorológicos comerciais disponíveis e a falta de kits produzidos usando linhagens Tc I e Tc IV, é importante o desenvolvimento de testes sorológicos usando linhagens do Amazonas. A técnica de ELISA- *in house* usando combinação de extratos de antígenos obtidos de isolados de *T. cruzi* autóctones do Amazonas, pode ser uma boa ferramenta no diagnóstico.

2. OBJETIVOS

2.1. *Geral*

Investigar a sensibilidade e especificidade de extratos de antígenos combinados obtidos de isolados de *T. cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas em soros de pacientes com diagnóstico para doença de Chagas.

2.2. *Específico*

Estimar a sensibilidade e especificidade da combinação de diferentes extratos de antígenos, *T. cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas, em soros positivos e negativos de pacientes com diagnóstico para DCC.

Estimar a sensibilidade e especificidade da combinação de diferentes extratos de antígenos, *T. cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas, em soros de pacientes com histórico de Leishmaniose.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO-MANUSCRITO

Avaliação da Atividade Antigênica de Extratos Combinados de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV Circulantes na Região Amazônica

Sabrina Silva de Brito¹, Susan Smith Doria¹, Adriano Gomes-Silva³, Matheus Martins Monteiro¹, Arineia Soares da Silva¹, Jessica Vanina Ortiz¹, Débora Raysa Teixeira de Sousa, Emily de Sousa Moura⁴, Rubens Celso Andrade da Silva Junior², Jorge Augusto de Oliveira Guerra^{1,2}, Maria das Graças Vale Barbosa Guerra^{1,2*}

1. Universidade do Estado do Amazonas (UEA); 2. Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) 3. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-FIOCRUZ); 4. Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

*mgvale@uea.edu.br

Resumo

A tripanossomíase americana é uma doença negligenciada que se manifesta em uma fase aguda onde recomenda-se o exame parasitológico pela alta parasitemia, e em uma fase crônica na qual é recomendado o exame sorológico devido à baixa parasitemia. Para ser considerado como um diagnóstico positivo é preciso que pelo menos dois testes sorológicos se apresentem reativos, entre esses testes está o ensaio imunoenzimático – ELISA. Nos estudos de sorologia para doença de Chagas, na região Amazônica, tem sido encontrados resultados discordantes nos testes sorológicos comerciais disponíveis e há a falta de kits produzidos usando linhagens do Amazonas sendo importante o desenvolvimento de testes sorológicos usando essas linhagens. O objetivo deste estudo foi investigar a sensibilidade e especificidade de extratos de antígenos combinados obtidos de isolados de *T. cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas. Foram testadas pelo método de ELISA-*in house* sete combinações de extratos

de *T. cruzi* TcI e TcIV isolados de humanos e triatomíneos, procedentes de quatro municípios do estado do Amazonas. A média entre as densidades óticas das combinações dos extratos de antígenos em todos os grupos de soros dos pacientes, apresentou diferença significativa $p < 0.0001$. Ao comparar os valores obtidos dos extratos totais, observou-se 0.89 na área da curva ROC e 95% e 84% de sensibilidade e especificidade respectivamente na combinação do isolado de *T. cruzi* TcI obtido de *Rhodnius robustus*. Observou-se também 0.87 na área da curva ROC e 89% e 81% de sensibilidade e especificidade respectivamente na combinação do isolado de *T. cruzi* TcIV obtido de humanos com histórico de transmissão oral. Foi observado ainda que quando inseridos os soros de pacientes com histórico de leishmaniose, a especificidade e sensibilidade do teste baixou, podendo ser associada com reatividade cruzada, diminuindo também as áreas das curvas ROC em todas as combinações testadas.

Palavras chaves. Doença de Chagas, ELISA-*in house*, Linhagens TcI e TcIV, Sorologia.

Introdução

A doença de Chagas-DC, originária da América Latina, é atualmente um problema de saúde mundial, incluída no grupo das doenças negligenciadas, uma vez estima-se que haja entre 6-7 milhões de pessoas infectadas e dessas, 1,6 milhão estão no Brasil (1).

Na Amazônia, nos últimos anos, tem aumentado a frequência de registros de casos agudos, sobre tudo, em surtos por transmissão oral, pelo consumo de açai (2), e, muitas situações diferem das regiões endêmicas como por exemplo: a) seu agente etiológico o *Trypanosoma cruzi* (protozoário heteróxico), é mantido em ciclo silvestre complexo, facilitado pela alta diversidade de espécies, possibilitando a troca de hospedeiros, mamíferos e insetos hematófagos, os triatomíneos (3), resultando em modificações biológicas, diferenciação em suas estruturas e metabolismo; b) tem se reportado três das sete linhagens do *T. cruzi*

TcI, TcIII e TcIV (2,4–7) (o *T. cruzi* está classificado em sete Unidades Discretas de Tipagem-DTU, (Discrete Typing Units) TcI-TcVI (8), e TcBat (9); c) o homem, se insere no ciclo do *T. cruzi*, eventualmente, na maioria das vezes acidentalmente, se infectando, manifestando ou não sintomatologia; - os casos registrados na fase aguda, são detectados através de exame parasitológico a gota espessa (10); d) os casos da doença crônica, principalmente indeterminada, são detectados através de testes imunológicos em bancos de sangue e inquéritos sorológicos (11).

No diagnóstico da DC na fase aguda, devido a alta parasitemia, recomenda-se o uso de exames parasitológicos, e complementa-se com exames sorológicos detectando-se imunoglobulinas IgM; na fase crônica por haver baixa ou nenhuma parasitemia, é recomendado o exame sorológico, detectando-se imunoglobulinas IgG, nesse caso é necessário pelo menos dois testes reativos, o ensaio imunoenzimático - ELISA, a hemaglutinação indireta – HAI, a imunofluorescência indireta – IFI ou Western blot (12,13).

Em inquéritos sorológicos realizados no Amazonas tem se encontrado divergências nos resultados dos kits comerciais usados, dificultando o diagnóstico da doença de Chagas crônica, uma vez que são testes produzidos com linhagens não descritas como circulantes nessa região (4,11,14,15), supõem-se que isso possa afetar a sensibilidade e a especificidade dos testes. Além disso, tem-se encontrado casos de infecção tanto em humanos (16), como em triatomíneos vetor (17), com mais de uma linhagem, tornando de grande relevância os estudo sobre as linhagens circulantes em diferentes regiões geográficas, testando-se a sensibilidade e especificidade de extratos de antígenos obtidos de isolados de *T. cruzi* autóctones. Assim, o objetivo desse estudo foi testar através da técnica de ELISA-*in house* extratos de antígenos combinados, obtidos de *T. cruzi* autóctones do estado do Amazonas.

Material e métodos

O estudo foi realizado no laboratório de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado-FMT-HVD, instituição de referência para

doenças infecciosas e tropicais da região amazônica e faz parte de um projeto maior financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas-FAPEAM, Edital Universal 2018.

Massa parasitária. Para a produção da massa parasitária foram utilizados diferentes isolados de *Trypanosoma cruzi* proveniente de pacientes com doença de Chagas aguda e de vetor, de diferentes municípios do estado do Amazonas como mostrado na Tabela 1. Esses isolados estavam preservados em nitrogênio líquido no laboratório de Entomologia da FMT-HVD, e foram descongelados e cultivados no meio NNN, para posterior cultivo em meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) para multiplicação das formas epimastigotas de forma axênica. Ao término do cultivo, a massa parasitária foi obtida pela centrifugação, 20 min a 3500 x g por 20 minutos, a 4°C, das formas parasitárias suspensas no meio de cultura. O sobrenadante de cultura foi descartado e o precipitado foi congelado até a etapa de obtenção dos preparados antigênicos.

Tabela 1. Isolados utilizados para as combinações de antígenos.

Isolado/DTU	Procedência	Hospedeiro
AM 61/TcI	Apuí	<i>Rhodnius robustus</i>
AM 49/TcI	Coari	Humano
AM 69/TcIV	Santa Isabel do Rio Negro	Humano
AM 140/TcIV	Carauari	Humano

Obtenção dos antígenos. Para a obtenção dos antígenos, a massa parasitária de cada isolado foi processada por separado pelo método de ultrassom, realizado no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Foi utilizada a fragmentação física dos parasitos em 3 preparações diferentes denominados T2, T4 a T5. Onde em T2 a massa parasitária foi ressuspensa em 200 µl de tampão HEPES-DTT em microtubos de 1,5ml, em T4 a massa parasitária foi ressuspensa em 500µl de tampão TRIS em microtubo de 1,5ml e

T5 a massa parasitária foi ressuspensa em 500µl de tampão PBS em microtubos de 1,5ml. Após incubação de 30 min em gelo, estes foram em banho de ultrassom por 30 min (UltraCleaner 750A). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 20 min, a 4°C. O sobrenadante contendo antígeno solúvel foi aliquoteado e congelado para posterior dosagem de proteínas. A concentração de proteína foi determinada pelo Kit de Ensaio de proteína BCA Pierce (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante e os extratos foram armazenados em -20°C.

ELISA-*in house*. Para o ELISA-*in house* foram sensibilizadas placas de poliestireno (Thermo Fisher Scientific) - 96 poços usando 50µL de solução contendo de 2.5µg/ml de cada extrato em tampão de carbonato/bicarbonato (NaHCO₃/Na₂CO₃) com pH de 9.6 aproximadamente e incubado overnight a 4°C. Posteriormente à incubação, as placas foram lavadas 3 vezes em solução de PBS/0.05% Tween 20 e bloqueadas por 2 horas com 200µL de solução SFB 10% em PBS. As placas foram lavadas novamente e incubadas overnight com 50µL/poço dos soros na diluição de 1:100 em duplicata. No dia seguinte, as placas são lavadas 6 vezes e incubadas por 1 hora com 50µL de anti-IgG humano conjugado com peroxidase (INVITROGEN®) na diluição de 1:500, posteriormente foram lavadas e foi adicionado o substrato O-Fenilendiamina, incubando as placas por 10 minutos, para posteriormente adicionar a solução de parada (HCl 2N). Para determinar os valores de absorbância foi utilizada uma leitora de microplaca (ThermoPlate) a 492nm.

Amostras de soros. Foram utilizadas um total de 84 amostras de soro, sendo 42 amostras de pacientes com diagnóstico clínico da doença de Chagas crônica, com sorologia reativa em pelo menos dois testes sorológicos comerciais (IgG anti-*T.cruzi*) diferentes, cinco destes pacientes diagnosticados apresentaram comprometimento cardíaco e dois com PCR positiva. Dos 37 pacientes crônicos indeterminados, nove tiveram PCR positiva. Além disso, foram utilizadas 26 amostras de soro de voluntários sem sinais e sintomas de doença de Chagas e que não apresentaram reatividade nos testes sorológicos ((IgG anti-*T.cruzi*). Para avaliar a reatividade cruzada foram utilizados 16 soros de pacientes com

histórico de leishmaniose tegumentar. Todos os soros foram obtidos de voluntários que participaram em inquéritos sorológicos no Estado Amazonas e que estão preservados na soroteca do laboratório de Entomologia da FMT-HVD.

Análise de dados. Para análise das combinações entre os extratos foram realizadas duas curvas ROC, uma com os soros *T. cruzi* positivos e negativos e a outra incluindo os soros *T. cruzi* negativos com soros de pacientes com histórico de leishmaniose. Foram usadas as curvas ROC para obter a área, a sensibilidade, especificidade e *cut off*. Foi realizado o teste ANOVA para comparação das densidades óticas dos soros positivos e negativos para doença de Chagas, e com soros de pacientes com histórico de leishmaniose.

Aspectos éticos. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética - CEP da FMTHVD, no. CAAE: 97505318.7.0000.0005.

Resultado/Discussão

ELISA- in house. Foram utilizados sete extratos de antígenos de *T. cruzi* (Tabela 2), e baseado na sua sensibilidade e especificidade mostrada na análise individual de cada antígeno pelo método de ELISA-in *house* observado na Tabela 2, foram desenhadas sete combinações diferentes (Tabela 3).

Tabela 2 – Extratos de antígenos obtidos da região amazônica.

Extratos de antígenos	DTU	Área *Tc+ X Tc-	Sens/Esp (%)	Cut-Off	Área Tc+ X Tc- + PL+	Sens/Esp %	Cut-Off
AM 61 T2 (HEPES)	Tcl	0.84	83/81	639,3	0.75	75/71	685,3
AM 61 T5 (PBS)	Tcl	0.82	79/76	788,5	0.80	76/72	806,8
AM 49 T2 (HEPES)	Tcl	0.85	77/75	380,8	0.77	69/68	408
AM 69 T2 (HEPES)	TclV	0.81	81/75	617,8	0.75	65/75	722
AM 69 T4 (TRIS)	TclV	0.92	86/88	1.089	0.84	86/79	1.134
AM 69 T5 (PBS)	TclV	0.79	70/72	765,8	0.69	62/67	851
AM 140 T4 (TRIS)	TclV	0.92	87/84	1.112	0.85	74/84	1.321

*Tc+ (*Trypanosoma cruzi* positivo); Tc- (*Trypanosoma cruzi* negativo); PL (Pacientes com histórico de Leishmaniose)

Tabela 3 - Combinações de extratos de antígenos

Experimento	DTU	Combinação Extrato de Antígeno
1	Tcl	AM61T2 (HEPES)+ AM61T5 (PBS)
2	TcIV	AM69T4 (TRIS) + AM69T5 (PBS)
3	TcIV	AM69T2 (HEPES) + AM69T4 (TRIS)
4	TcIV	AM69T4 (TRIS) + AM140T4 (TRIS)
5	Tcl+TcIV	AM49T2(HEPES) + AM140T4 (TRIS)
6	Tcl + TcIV	AM61T5 (PBS) + AM69T4 (TRIS)
7	Tcl + TcIV	AM61T2 (HEPES) + AM69T4 (TRIS)

As médias entre as densidades óticas do grupo de soros positivos e negativo para *T. cruzi* e do grupo de negativo junto com os soros de leishmaniose (Tabela 4) apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,0001$). Esses mesmos testes podem ser observados nos estudos com antígenos, que comparam as densidades óticas para saber se apresentam diferença, no entanto, esses estudos utilizam antígenos fixados, antígenos de excreção/secreção (TESA), e mencionam linhagens Tc II e Tc VI, mas nenhum tem testado antígenos da linhagem TcIV. (18–20).

Tabela 4 - Médias das densidades óticas dos soros na testagem com a combinação de antígenos

Combinações	*Tc -	*Tc +	Tc- X *PL+	ANOVA
AM61 T2 + T5	727.1	1196	778.5	$p < 0,0001$
AM69 T4 + T5	677.1	1087	766.4	$p < 0,0001$
AM69T4 + AM140T4	146.7	375.9	168	$p < 0,0001$
AM69 T2 + T4	664.9	1156	690.5	$p < 0,0001$
AM140 T4 + AM49 T2	682.6	1023	761.1	$p < 0,0001$
AM61 T5 + AM69 T4	602.5	1098	636	$p < 0,0001$
AM61 T2+ AM69 T4	518.4	976.2	599.5	$p < 0,0001$

*Tc+ (*Trypanosoma cruzi* positivo); Tc- (*Trypanosoma cruzi* negativo); PL (Pacientes com histórico de Leishmaniose)

Observou-se que a médias das densidades óticas dos soros na testagem com a combinação de antígenos na combinação do isolado *T. cruzi* Tcl (AM61T5) + o

isolado de *T.cruzi* TcIV (AM69T4) entre os positivos e os negativos foi de 495.5. E no isolado *T.cruzi* TcIV (AM69 T2 +T4) foi de 491.1

Curva ROC. Através das análises das combinações pela Curva ROC observou-se maior sensibilidade e especificidade nas curvas onde não foram analisados os soros de leishmaniose, comparado com as que incluíram esses soros, sugerindo reatividade cruzada. Os valores de *cut off* foram diferentes em todas as combinações, e foram obtidos segundo as melhores sensibilidade e especificidade encontradas na curva ROC (Tabela 5).

A combinação de extrato TcI AM61 T2 + T5 foi a que se melhor apresentou com uma área de 0.89 e uma sensibilidade e especificidade de 95% e 84% respectivamente (Figura 1). Sugerindo que os extratos desta combinação podem ser uma boa possibilidade na utilização de testes sorológicos, uma vez que nos soros testados de pacientes se tem a linhagem TcI circulante.

Quando foram inseridos os soros de pacientes com leishmaniose, a especificidade e sensibilidade do teste baixou, diminuindo assim também as áreas das curvas ROC, podendo-se associar isso à reatividade cruzada, a qual foi observada em todas as combinações.

A reatividade cruzada é uma problemática muito mencionada nos estudos de testes sorológicos que usam antígenos totais de *T. cruzi*, ainda mais com leishmaniose, já que os dois parasitos têm muitas similitudes (15,19,21–24). Nesta pesquisa foram usados esses tipos de antígenos, mesmo que reatividade cruzada já seja um resultado esperado, porém, sendo a primeira vez que são isolados extratos totais de linhagens autóctones do estado do Amazonas. No entanto esse problema pode ser solucionado com a separação e seleção de antígenos mais específicos que estejam presentes no extrato total.

Tabela 5. Valores das análises obtidos das combinações de antígenos pela curva ROC.

Combinações	DTU	Área	Sens/Esp	Cut-Off	Área	Sens/Esp	Cut-Off
		T. cruzi (+) /T. cruzi (-)	(%)		T. cruzi (+) X T. cruzi (-) + Leish(+)	(%)	
AM61 T2 + AM61 T5	Tcl	0.89	95/84	765	0.82	78/73	831,8
AM69 T4 + AM69 T5	TclV	0.78	72/69	754,5	0.69	61/60	782,3
AM69T4 + AM140T4	TclV	0.88	84/76	164,5	0.79	79/70	176
AM69 T2 + AM69 T4	TclV	0.87	89/81	690,3	0.83	79/70	721
AM140 T4 + AM49 T2	Tcl + TclV	0.79	69/69	749,5	0.69	66/62	802,8
AM61 T5 + AM69 T4	Tcl + TclV	0.85	82/81	616,5	0.80	78/71	685,3
AM61 T2+ AM69 T4	Tcl + TclV	0.84	76/76	580,5	0.75	71/63	618,3

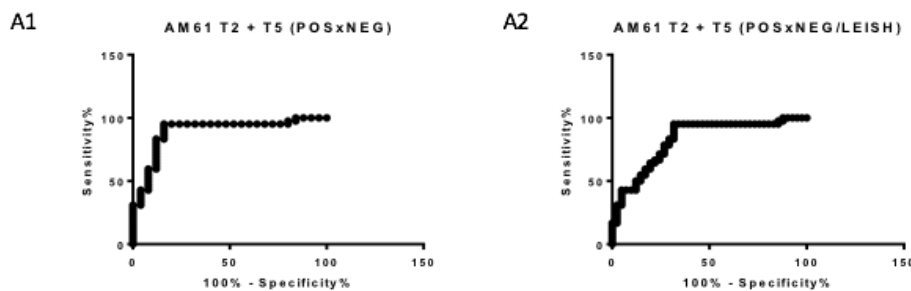


Figura 1. Curva ROC da combinação de extrato TcI AM61 T2 + T5. **A1.** Soros positivos x negativos. Área 0.89. Sensibilidade 95% e especificidade 84%, com *cut-off* de 765. **A2.** Soros positivos x negativos e leishmaniose. Área 0.82. Sensibilidade 78% e especificidade 73%, com *cut-off* de 831.

O estado do Amazonas é uma área endêmica para leishmaniose (25), dificultando assim o diagnóstico e aumentando a problemática da reatividade cruzada na população tanto com histórico de leishmaniose, como com população que não tem o histórico de ter desenvolvido a doença.

Combinações de extratos x extratos. A combinação de antígenos recombinantes já tem sido usado para testes sorológicos(26). Neste trabalho, combinou-se diferentes extratos totais e foi observado que a combinação que teve melhor resultado no critério da área comparado com as áreas dos extratos avaliados individualmente (Tabela 2) foi do isolado de *T.cruzi* TcI obtido de *Rhodnius robustus* provenientes do município de Apuí (AM61 T2 + T5) onde observou-se 0.89 na área da curva ROC e 95% e 84% de sensibilidade e especificidade respectivamente (Tabela 5). Observou-se também 0.87 na área curva ROC e 89% e da 81% de sensibilidade e especificidade respectivamente (Tabela 5) na combinação do isolado de *T.cruzi* TcIV obtido de humanos provenientes do município de Santa Izabel do Rio Negro (AM69 T2 + T4).

Considerações finais

Neste estudo foi observado que as combinações de extratos de antígenos combinados obtidos de isolados de *T. cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas apresentaram variadas sensibilidades e especificidades, diferente da testagem

individual. Os melhores resultados foram da combinação do isolado de *T.cruzi* TcI do município de Apuí, obtido do vetor *Rhodnius robustus* (AM61 T2 + T5) e na combinação do isolado *T.cruzi* TcIV obtido de humanos provenientes do município de Santa Izabel do Rio Negro (AM69 T2 + T4). Quando inseridos os soros de pacientes com histórico de leishmaniose, a especificidade e sensibilidade do teste baixou, diminuindo assim as áreas das curvas ROC em todas as combinações testadas, indicando a reatividade cruzada, problemática comum no uso de antígenos totais. Este é um dos primeiros estudos que avaliou a performance de antígenos extraídos de linhagens TcI e TcIV isoladas circulantes no estado do Amazonas com o intuito de melhorar o diagnóstico da doença de Chagas na região, desta forma, por se tratar de ensaios iniciais, serão precisos estudos posteriores que visem solucionar a reatividade cruzada.

Referências bibliográficas

1. WHO. Integrating neglected tropical diseases into global health and development. Fourth WHO report on neglected tropical diseases. 2017.
2. Santana RAG, Barbosa M das GV, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz J V, Oliveira M, et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. 2019;25(1):25–8.
3. Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop* [Internet]. 2015;151:1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.018>
4. Barbosa M das GV, Barbosa-ferreira JM, Arcanjo ARL, Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, et al. Chagas disease in the State of Amazonas : history , epidemiological evolution , risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(December):27–33.
5. Monteiro WM, Magalhães LKC, Santana FS, Borborema M, Silveira H, Vale Barbosa M das G. Short Communication *Trypanosoma cruzi* TcIII / Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. *Trop Med Int Heal*. 2010;15(9):1049–51.
6. Monteiro WM, Magalhães LKC, de Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJ de O, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute chagas

disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One*. 2012;7(7).

7. Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, Prestes SR, Maciel MG, da Silva GAV, et al. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasite*. 2014;7:1–7.
8. Zingales B, Andrade SG, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature : second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(November):1051–4.
9. Ramirez J, Hernandez C, Montilla M, Zambrano P, Flores AC, Parra E, et al. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses Public Health*. 2014;61:477–9.
10. Monteiro WM, Barbosa MDGV, Guerra JA de O, de Melo GC, Barbosa LRA, Machado KVA, et al. Driving forces for strengthening the surveillance of chagas disease in the brazilian amazon by “training the eyes” of malaria microscopists. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020;53:10–2.
11. Magalhães BML, Coelho LI, Maciel MG, Barbosa-ferreira JM, Umezawa ES, Coura JR, et al. Serological survey for Chagas disease in the rural areas of Manaus , Coari , and Tefé in the Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(6):697–702.
12. Pinto Dias JC, Novaes Ramos A, Dias Gontijo E, Luquetti A, Aparecida Shikanai-Yasuda M, Rodrigues Coura J, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2015;25(21):1–10.
13. WHO. Control of Chagas disease. World Health Organization - Technical Report Series. 2002.
14. Coura JR, Marquez MHP, Guerra JADO, Zauza PL, Miguel JC, Pereira JB. A new survey of the serology of human *Trypanosoma cruzi* infection in the Rio Negro microregion , Brazilian Amazon : a critical analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(November):909–13.
15. Sánchez B, Monteón V, Reyes A, Espinoza B. Standardization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot for Detection of *Trypanosoma cruzi* Antibodies Using Extracts from Mexican Strains as Antigens. *Arch Med Res*. 2001;32(April):382–8.
16. Cura CI, Lucero RH, Bisio M, Oshiro E, Formichelli LB. *Trypanosoma cruzi*

- Discrete Typing Units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology*. 2012;139:516–21.
17. Araújo CAC, Waniek PJ, Jansen AM. TcI / TcII co-infection can enhance *Trypanosoma cruzi* growth in *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors*. 2014;7:1–8.
 18. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschelk M, Aché A, Lacouture S, et al. Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas disease in Venezuela blood banks : comparison of assays using fixed-epimastigotes , fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted – secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains. *Transfus Med*. 2006;16(7):419–31.
 19. Berrizbeitia M, Ndao M, Gottschalk M, Ache A, Lacouture S, Medina M, et al. Purified Excreted-Secreted Antigens from *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes as Tools for Diagnosis of Chagas ' Disease. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):291–6.
 20. Umezawa ES, Nascimento MS, Stolf AMS. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas ' disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;39(January):169–76.
 21. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(8):1045–9.
 22. Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gàrate T, et al. Comparación de técnicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(5):284–93.
 23. Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, Lagunes-Castro MDS, Álvarez-Martínez C, Hernández-Lutzon MJ, Dumonteil E, et al. Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz , Mexico : role of the antigen used for diagnostic. *Parasit Vectors*. 2015;8:1–8.
 24. Riera C, Vergés M, López-Chejade P, Piron M, Gascón J, Fisa R, et al. Desarrollo y evaluación de una técnica ELISA con antígeno crudo de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Enf Emerg*. 2009;11(January):22–9.
 25. Guerra JA de O, Ribeiro JAS, Coelho LI, Barbosa M das GV, Paes MG.

Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João , Manaus , Amazonas , Brasil Epidemiology of tegumentary leishmaniasis. Cad Saúde pública. 2006;22(11):2319–27.

26. Granjon E, Saba E, Sabino E, Campos L. Development of a Novel Multiplex Immunoassay Multi-cruzi for the Serological Confirmation of Chagas Disease. PLoS. 2016;1–15.

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Os extratos utilizados no trabalho são totais e ainda não estão caracterizados, pretende-se realizar estudos mais específicos para a identificação das proteínas específicas nos extratos que estão mostrando a atividade antigênica, e assim também diminuir a reatividade cruzada que foi anteriormente descrita.

Para este trabalho foram utilizados soros de amostras de pacientes do estado Amazonas, no futuro pretende-se acrescentar amostras de soro negativo de áreas não endêmicas para DC e também para leishmaniose.

5. CONCLUSÃO

Através da técnica de ELISA - *in house* foram estimadas as sensibilidades e especificidades de 7 combinações de dois extratos de antígenos cada uma.

Foi observado que todas apresentaram diferença nas médias, evidenciando a atividade antigênica, onde as melhores sensibilidades e especificidades foram obtidas na combinação do isolado de *T.cruzi* TcI do município de Apuí, obtido do vetor *Rhodnius robustus* (AM61 T2 + T5) e na combinação do isolado *T.cruzi* TcIV obtido de humanos provenientes do município de Santa Izabel do Rio Negro (AM69 T2 + T4).

Na testagem dos soros dos pacientes com histórico de leishmaniose, a área da curva ROC foi afetada em todas as combinações, onde os valores de sensibilidade e especificidade diminuíram, indicando reatividade cruzada nos testes.

6. REFERÊNCIAS

1. Who. Integrating neglected tropical diseases into global health and development. Fourth WHO report on neglected tropical diseases. 2017.
2. CDC. Parasite-Neglected Parasitic Infections [Internet]. 2017. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/npi/>
3. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):240–53.
4. Becerril M. *Parasitologia médica*. 4a ed. Mc Graw Hill Education; 2014. 95-104 p.
5. Gomes LMX, Santos AC, Lima FR, Barbosa TLA, Teles JT. O impacto da doença de Chagas no cotidiano do portador The impact of Chagas ' disease in daily patient. 2012;8:39403.
6. Oliveira BG, Abreu mery natali S, Abreu CDG, Da Costa Rocha MO, Ribeiro AL. Health-related quality of life in patients with chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(2):150–6.
7. Coura JR. Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre a doença de chagas. In: Scielo Books. 1997.
8. Martins A, Gomes AP, Mendonça E, Fietto J, Santana LA, Oliveira MG, et al. Biology of *Trypanosoma cruzi* : An update. 2012;16(1):45–58.
9. DIAS J, COURA J. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. *Clínica e Ter da doença Chagas uma abordagem prática para o clínico geral.* 1997;24–31.
10. Mesquita RD, Vionette-amaral RJ, Lowenberger C, Rivera-pomar R, Dansa M, Daumas-filho CRO, et al. Genome of *Rhodnius prolixus* , an insect vector of Chagas disease , reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *PNAS Early Ed.* 2015;1–6.
11. Schofield CJ. The behaviour of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae): A review. *Bull Entomol Res.* 1979;69(3):363–79.

12. Schofield CJ. Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cad Saúde pública*. 2000;16:89–92.
13. Azambuja P. Ciclo evolutivo. Portal da Doença de Chagas - Fiocruz. 2017;
14. Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(September):641–5.
15. Ribeiro a L, Rocha MO. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31(3):301–14.
16. Barbosa M das GV, Barbosa-ferreira JM, Arcanjo ARL, Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, et al. Chagas disease in the State of Amazonas : history , epidemiological evolution , risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(December):27–33.
17. Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT. Geographic distribution of chagas disease vectors in brazil based on ecological niche modeling. *J Trop Med*. 2012;2012.
18. Deane M, Lenzi H, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984;79:513–5.
19. Herrera L. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Bol ALARIOLOGIA Y SALUD Ambient*. 2010;L:1–14.
20. Magalhães L, MGVB, CM C, MP F, NF F, FAA F, et al. Vetores e reservatórios da doença de Chagas no Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41:227–8.
21. Zingales B, Andrade SG, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature : second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(November):1051–4.
22. Andrade S. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop*. 1974;3.

23. Murta SMF, Romanha AJ. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(SUPPL. 1):177–80.
24. CONITEC. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. 2018.
25. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol. 1973;27(1):347–82.
26. Monteiro WM, Magalhães LKC, Santana FS, Borborema M, Silveira H, Vale Barbosa M das G. Short Communication *Trypanosoma cruzi* TcIII / Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. Trop Med Int Heal. 2010;15(9):1049–51.
27. Monteiro WM, Magalhães LKC, de Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJ de O, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. PLoS One. 2012;7(7).
28. Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, Prestes SR, Maciel MG, da Silva GAV, et al. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. Parasite. 2014;7:1–7.
29. Santana RAG, Barbosa M das GV, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz J V, Oliveira M, et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. 2019;25(1):25–8.
30. Mattos ER; Mattos ER; Berto BP. Doença de Chagas: Uma breve revisão das recentes ocorrências, vias de transmissão e métodos diagnósticos. Saúde e Ambient em Rev. 2011;6(July 2011):40–5.
31. Muñoz-Calderón A, Díaz-Bello Z, Valladares B, Noya O, López MC, Alarcón De Noya B, et al. Oral transmission of Chagas disease: Typing of *Trypanosoma cruzi* from five outbreaks occurred in Venezuela shows multiclonal and common infections in patients, vectors and reservoirs. Infect Genet Evol [Internet]. 2013; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.036>
32. Ramirez JD, Montilla M, Cucunuba ZM, Florez AC, Zambrano P, Guhl F. Molecular Epidemiology of Human Oral Chagas Disease Outbreaks in Colombia. PLoS. 2013;7(2):1–8.

33. Secretaria de Vigilância em Saúde-Ministério da Saúde-Brasil. Boletim Epidemiológico. 2015;46.
34. Dias JCP, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. 2012.
35. Pinto Dias JC, Novaes Ramos A, Dias Gontijo E, Luquetti A, Aparecida Shikanai-Yasuda M, Rodrigues Coura J, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol e Serviços Saúde. 2015;25(21):1–10.
36. Borborema MDM, Guerra JADO, Lacerda MVG. Meningoencephalitis in a patient with acute Chagas disease in the Brazilian Amazon. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(5):520–1.
37. Dias JCP. Acute Chagas' disease. Vol. 79, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1984. p. 85–91.
38. Monteiro WM, Barbosa M das G, Toledo MJDO, Fé FA, Fé NF. Série de casos agudos de doença de Chagas atendidos num serviço terciário de Manaus , Estado do Amazonas , de 1980 a 2006. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(2):207–10.
39. Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Considerações Sobre a Epidemiologia dos Primeiros casos Autóctones de Doença de Chagas Registros. Rev Saúde Públ. 1969;3:153–7.
40. Ferraroni J, Nunes de Melo J, Camargo ME. Moléstia de Chagas na Amazônia. Ocorrência de seis casos suspeitos, sorologicamente positivos. ACTA Amaz. 1977;7(3):438–40.
41. Fé NF, França MS, Carvalho-Costa FA. Reassessing the entomological investigation around the first autochthonous case of Chagas disease in Western Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(1):121–3.
42. Borborema M, Guerra J, Malheiros R, Fé N, Lacerda M de, Mourão MP, et al. Doença de Chagas urbana em Tefé-AM: Relato de nove casos com suspeita de transmissão oral. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2005.
43. Souza-Lima R de C, Barbosa M das GV, Coura JR, Arcanjo ARL, Nascimento

- A da S, Ferreira JM, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(4):510–4.
44. Barbosa-Ferreira JMB, Guerra JA de O, Barbosa M das GV. Ventricular aneurysm in a chronic Chagas disease patient from the Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(4):474–5.
45. Barbosa-Ferreira JM, Augusto J, Guerra DO, Simões F, Filho DS, Maria B, et al. Cardiac involvement in Acute Chagas' Disease cases in the Amazon region. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(6):147–9.
46. Barbosa-ferreira JM, Guerra JADO, Magalhães BML, Coelho LIARC, Maciel MG, Vale Barbosa M das G. Chronic Chagasic Cardiopathy in Amazon Region : An Etiology to Remember. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(6):93–5.
47. Coura JR, Junqueira AC V, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002;18(4):171–6.
48. Magalhães BML, Coelho LI, Maciel MG, Barbosa-ferreira JM, Umezawa ES, Coura JR, et al. Serological survey for Chagas disease in the rural areas of Manaus , Coari , and Tefé in the Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(6):697–702.
49. Viñas Albajar P, Velihovetchi Laredo S, Brasil Terrazas M, Rodrigues Coura J. Miocardiopatia dilatada em pacientes com infecção chagásica crônica. Relato de dois casos fatais autóctones do Rio Negro, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(3):401–7.
50. Pinto A, Ferreira A, Valente V, Harada G, Valente S. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev Panam Salud Publica.* 2009;25(1):77–83.
51. Xavier SS, Sousa AS, Viñas PA, Junqueira AC V, Bóia MN, Coura JR. Cardiopatia chagásica crônica no Rio Negro, Estado do Amazonas. Relato de três novos casos autóctones, comprovados por exames sorológicos, clínicos, radiográficos do tórax, eletro e ecocardiográficos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(2):211–6.
52. WHO. Control of Chagas disease. World Health Organization - Technical Report Series. 2002.

53. Lapa JS, Saraiva RM, Hasslocher-Moreno AM, Georg I, Souza AS, Xavier SS, et al. Dealing with initial inconclusive serological results for chronic Chagas disease in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(6):967–74.
54. Luquetti A, Rassi A. Diagnóstico Laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. 2000. 344-378 p.
55. Sánchez B, Monteón V, Reyes A, Espinoza B. Standardization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot for Detection of *Trypanosoma cruzi* Antibodies Using Extracts from Mexican Strains as Antigens. *Arch Med Res*. 2001;32(April):382–8.
56. Guzmán-Gómez D, López-Monteón A, Lagunes-Castro MDS, Álvarez-Martínez C, Hernández-Lutzon MJ, Dumonteil E, et al. Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz , Mexico : role of the antigen used for diagnostic. *Parasit Vectors*. 2015;8:1–8.
57. Enciso C, Montilla M, Santacruz MM, Nicholls RS, Rodríguez A, Mercado M, et al. Comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, un inmunoensayo enzimático y la prueba comercial Chagatek para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*. *Biomédica*. 2004;24(1):104–8.
58. Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gàrate T, et al. Comparación de técnicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(5):284–93.
59. Bucio MI, Cabrera M, Segura EL, Zenteno E, Salazar-schettino M. Identification of Immunodominant Antigens in Mexican Strains of *Trypanosoma cruzi*. Identif immunodominant antigens Mex strains *Trypanos cruzi*. 1999;28(March):257–68.
60. Perez-Fuentes R, Sanchez-Guillen M del C, Gonzalez-Alvarez C, Monteón VM, Reyes PA, Rosales-Encina JI. Humoral nitric oxide levels and antibody immune response of symptomatic and indeterminate Chagas disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma cruzi* antigen. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58(6):715–20.
61. Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita , dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas ? *Rev da Biol*. 2011;6b:44–8.

62. Longhi SA, Brandariz SB, Lafon SO, Niborski LL, Luquetti AO, Schijman AG. Short Report : Evaluation of In-House ELISA Using Trypanosoma cruzi Lysate and Recombinant Antigens for Diagnosis of Chagas Disease and Discrimination of Its Clinical Forms. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(2):267–71.
63. Campbell D a, Westenberger SJ, Sturm NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med.* 2004;4(6):549–62.
64. Coura JR, Marquez MHP, Guerra JADO, Zauza PL, Miguel JC, Pereira JB. A new survey of the serology of human Trypanosoma cruzi infection in the Rio Negro microregion , Brazilian Amazon : a critical analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(November):909–13.
65. Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, et al. First report of human Trypanosoma cruzi infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses Public Health.* 2014;61:477–9.
66. Abras A, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, Ballart C. Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease : Is It Time for a. *J Clin Microbiol.* 2016;54(6):1566–72.
67. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *Clin Chem.* 2005;51(12):2415–8.
68. Crowther J. The ELISA Guidebook. Vol. 516, *Methods in Molecular Biology.* 2009.
69. Kawamura T. Interpretação de um Teste sob a Visão Epidemiológica. Eficiência de um Teste. *Arq Bras Cardiol.* 2002;79(4):437–41.
70. Hajian-Tilaki K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Casp J Intern Med.* 2013;4(2):627–35

7. ANEXOS

7.1. POP: Procedimento para preparação de 1L de PBS 20x.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO GERÊNCIA DE ENTOMOLOGIA

Código POP	POP_ENT_LB_003	Página 1/2
Título	Procedimento para preparação de 1L de PBS 20x.	
Idioma da versão original	Português	
Elaborado por: Susan Smith Doria	Revisado e Aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa	Data de aplicação:
Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento para a preparação de PBS para uso em técnicas sorológicas e moleculares.

2. DEFINIÇÕES

PBS: Tampão fosfato-salino. PBS é a abreviatura do inglês de Phosphate buffered saline.

3. APLICÁVEL A

O PBS se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

5. POP'S RELACIONADOS

Não aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

6.1.1 Proveta 1000ml

6.1.2 Garrafa de vidro limpa e seca para estocar reagents de 1000ml

6.1.3 Bécker

6.1.4 Magneto

Código POP	POP_ENT_LB_003	Página 2/2
------------	----------------	------------

6.2 Equipamentos:

- 6.2.1 Medidor de pH
- 6.2.3 Agitador magnético
- 6.2.4 Balança

6.3 Reagentes, meios e soluções:

- 6.3.1 Água tipo I ou II
- 6.3.2 Na₂HPO₄ 24g
- 6.3.3 NaH₂PO₄ H₂O 4.423g
- 6.3.4 NaCl 170g

7. PROCEDIMENTOS (3)**7.1 Preparação de PBS 20x**

- 7.1.1 Utilizar a proveta para medir o volume de 500ml e transferir para o bécker.
- 7.1.2 Colocar no bécker uma barra magnética e colocar o bécker numa agitadora sem aquecimento
- 7.1.3 Acrescentar os sais pesados anteriormente, deixar em agitação até estar completamente dissolvidos
- 7.1.4 Colocar no Becker o volume restante de 500ml
- 7.1.5 Deixar agitar mais minutos
- 7.1.6 Transferir o PBS 20x para a garrafa. Etiquetar e guardar na geladeira.

NOTA: Para uma solução de PBS 1x é preciso 50ml de PBS 20x e 950ml de água.

7.2. *POP: Procedimento da preparação do Tampão de bloqueio para o uso em ELISA.*



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
GERÊNCIA DE ENTOMOLOGIA

Código POP	POP_ENT_LB_004	Página 1/2
Título	Procedimento da preparação do Tampão de bloqueio para o uso em ELISA.	
Idioma da versão original	Português	
Elaborado por: Susan Smith Doria	Revisado e Aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa	Data de aplicação:
Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento para a preparação do Tampão de bloqueio preciso para uma placa de para uma ELISA.

2. DEFINIÇÕES

ELISA: ensaio imunoabsorção enzimática, do inglês Enzyme-linked immunoassay. O ELISA é um teste de laboratório comumente utilizada para a detecção de anticorpos no sangue.

3. APLICÁVEL A

O procedimento se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

5. POP'S RELACIONADOS

POP_ENT_LB_003 Procedimento para preparação de 1L de PBS 20x.

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

6.1.1 Pipetas de 10ml

6.1.2 Tubo Falcom

Código POP	POP_ENT_LB_004	Página 2/2
-------------------	----------------	-------------------

6.2 Equipamentos:

Nao aplica

6.3 Reagentes, meios e soluções:

6.3.1 POP_ENT_LB_003 Procedimento para preparação de 1L de PBS 20x.

6.3.2 Soro Fetal Bovino (SFB)

7. PROCEDIMENTOS (3)**7.1 Tampão de bloqueio para 96 poços (uma placa de ELISA)**

Para toda uma placa de ELISA é preciso 19.2ml de tampão de bloqueio, no caso de fazer mais de uma placa é preciso fazer o calculo para preparar o total necessário. É recomendável fazer 20ml, o uso do excedente é pelo erro da pipeta

7.1.1 Colocar num tubo Falcom 18ml de PBS 1x e adicionar 2ml de SFB (PBS1X+10%SFB)

7.3. *POP: Procedimento da preparação de Tampão de carbonato para o uso em ELISA.*



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

GERÊNCIA DE ENTOMOLOGIA

Código POP	POP_ENT_LB_005	Página 1/2
Título	Procedimento da preparação de Tampão de carbonato para o uso em ELISA.	
Idioma da versão original	Português	
Elaborado por: Susan Smith Doria	Revisado e Aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa	Data de aplicação:
Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento para a preparação do Tampão de carbonato para o uso na técnica de ELISA

2. DEFINIÇÕES

ELISA: ensaio imunoabsorção enzimática, do inglês Enzyme-linked immunoassay. O ELISA é um teste de laboratório comumente utilizada para a detecção de anticorpos no sangue.

3. APLICÁVEL A

O procedimento se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

5. POP'S RELACIONADOS

Não aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

6.1.1 Bécker

6.1.2 3 Garrafas de vidro limpa e seca para estocar reagents

6.1.3 Magneto

6.1.4 Proveta

Código POP	POP_ENT_LB_005	Página 2/2
------------	----------------	------------

6.2 Equipamentos:

- 6.2.1 Balança
- 6.2.3 Medidor de pH
- 6.2.4 Agitadora magnética

6.3 Reagentes, meios e soluções:

- 6.3.1 Água destilada
- 6.3.2 NaHCO_3 5.04g (para 1000ml)
- 6.3.3 Na_2CO_3 6.36g (para 1000ml)

7. PROCEDIMENTOS (3)

7.1 Solução A Bicarbonato de sodio

- 7.1.1 Utilizar a proveta para medir o volumen de 500ml de água e transferir para o bécker
- 7.1.2 Colocar no bécker uma barra magnética e colocar o bécker numa agitadora sem aquecimento
- 7.1.3 Acrescentar com 5.04 g de NaHCO_3 e deixar em agitação até estar dissolvido
- 7.1.4 Colocar no bécker o volume restante de 500ml
- 7.1.5 Deixar agitar mais minutos
- 7.1.6 Transferir a solução para uma garrafa e etiquetar na geladeira

7.2 Solução B Carbonato de sódio

- 7.2.1 Utilizar a proveta para medir o volumen de 500ml e transferir para o bécker
- 7.2.2 Colocar no bécker uma barra magnética e colocar o bécker numa agitadora sem aquecimento
- 7.2.3 Acrescentar com 6.36 g de Na_2CO_3 e deixar em agitação até estar dissolvido
- 7.2.4 Colocar no bécker o volume restante de 500ml
- 7.2.5 Deixar agitar mais minutos
- 7.2.6 Transferir a solução para uma garrafa e etiquetar na geladeira

7.3 Preparação do tampão

- 7.3.1 O tampão deve estar numa proporção de 4:1 (Sol A:Sol B)
- 7.3.2 O pH deve estar em aproximadamente 9.6

7.4. *POP: Procedimento da preparação do Tampão de lavado para o uso em ELISA*



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
GERÊNCIA DE ENTOMOLOGIA

Código POP	POP_ENT_LB_006	Página 1/2
Título	Procedimento da preparação do Tampão de lavado para o uso em ELISA.	
Idioma da versão original	Português	
Elaborado por: Susan Smith Doria	Revisado e Aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa	Data de aplicação:
Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento para a preparação de 1L de Tampão de lavado.

2. DEFINIÇÕES

ELISA: ensaio imunoabsorção enzimática, do inglês Enzyme-linked immunoassay. O ELISA é um teste de laboratório comumente utilizada para a detecção de anticorpos no sangue.

3. APLICÁVEL A

O procedimento se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

5. POP'S RELACIONADOS

POP_ENT_LB_003 Procedimento para preparação de 1L de PBS 20x.

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

6.1.1 Proveta de 1L

6.1.2 Pipeta de 1ml

6.1.3 Parafilm

Código POP	POP_ENT_LB_006	Página 2/2
-------------------	----------------	-------------------

6.2 Equipamentos:

Nao aplica

6.3 Reagentes, meios e soluções:

6.3.1 POP_ENT_LB_003 Procedimento para preparação de 1L de PBS 20x.

6.3.2 Tween 20

7. PROCEDIMENTOS (3)**7.1 Tampão de lavado PBS1x+0.05%Tween 20**

7.1.1 Colocar na proveta 1000ml de PBS 1x e adicionar 0.5ml de Tween 20

7.1.2 Usar Parafilm na proveta e mexer o tampão

7.1.3 Colocar o tampão na garrafa de solução de lavado na lavadora de microplacas

7.5. *POP: Procedimento da preparação do Tampão do OPD para o uso em ELISA.*



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
GERÊNCIA DE ENTOMOLOGIA

Código POP	POP_ENT_LB_007	Página 1/2
Título	Procedimento da preparação do Tampão do OPD para o uso em ELISA.	
Idioma da versão original	Português	
Elaborado por: Susan Smith Doria	Revisado e Aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa	Data de aplicação:
Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento para a preparação do Tampão de bloqueio preciso para uma placa de para uma ELISA.

2. DEFINIÇÕES

ELISA: ensaio imunoabsorção enzimática, do inglês Enzyme-linked immunoassay. O ELISA é um teste de laboratório comumente utilizada para a detecção de anticorpos no sangue.

OPD: O-Fenilenodiamina.

3. APLICÁVEL A

O procedimento se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

5. POP'S RELACIONADOS

Não aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

6.1.1 Bécker

6.1.2 Garrafas de vidro limpa e seca para estocar reagents

6.1.3 Garrafa âmbar

6.1.4 Magneto

6.1.5 Proveta

Código POP	POP_ENT_LB_007	Página 2/2
------------	----------------	------------

6.2 Equipamentos:

- 6.2.1 Balança
- 6.2.3 Medidor de pH
- 6.2.4 Agitadora magnética

6.3 Reagentes, meios e soluções:

- 6.3.1 Água destilada
- 6.3.2 Na_2HPO_4 1.19g (para 1000ml)
- 6.3.3 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 1.19g (para 1000ml)

7. PROCEDIMENTOS (3)

7.1 Solução A Fosfato de sódio

- 7.1.1 Utilizar a proveta para medir o volumen de 500ml e transferir para o bécker
- 7.1.2 Colocar no bécker uma barra magnética e colocar o bécker numa agitadora sem aquecimento
- 7.1.3 Acrescentar com 1.19 g de Na_2HPO_4 e deixar em agitação até estar dissolvido
- 7.1.4 Colocar no bécker o volume restante de 500ml
- 7.1.5 Deixar agitar mais minutos
- 7.1.6 Transferir a solução para uma garrafa e etiquetar na geladeira

7.2 Solução B Ácido cítrico

- 7.2.1 Utilizar a proveta para medir o volumen de 500ml e transferir para o bécker
- 7.2.2 Colocar no bécker uma barra magnética e colocar o bécker numa agitadora sem aquecimento
- 7.2.3 Acrescentar com 1.19 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ e deixar em agitação até estar dissolvido
- 7.2.4 Colocar no bécker o volume restante de 500ml
- 7.2.5 Deixar agitar mais minutos
- 7.2.6 Transferir a solução para uma garrafa e etiquetar na geladeira

7.3 Preparação do tampão

- 7.3.1 O tampão deve estar numa proporção de 1:1 (Sol A:Sol B)
- 7.3.2 Armazenar a 4°C em vidro âmbar
- 7.3.3 O pH deve estar entre 4.9 e 5.2

NOTA: Para diluir a pastilha de OPD (Thermo Scientific™) é usado 12mL do tampão.

7.6. Parecer ético

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO IN HOUSE DE TESTE IMUNOLÓGICO, PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA, UTILIZANDO LINHAGENS DE TRYPANOSOMA CRUZI CIRCULANTES NO ESTADO DO AMAZONAS

Pesquisador: MARIA DAS GRAÇAS VALE BARBOSA GUERRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 97505318.7.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM