

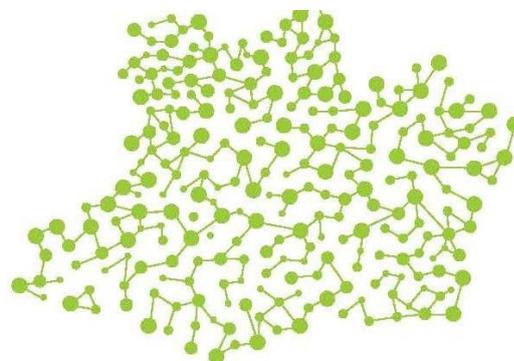


**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**ATIVIDADE DE ANTÍGENOS (DE EXCREÇÃO E SECREÇÃO) DE
EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV UTILIZANDO
ELISA *IN HOUSE***

EMILY DE SOUSA MOURA



**MANAUS
2023**

EMILY DE SOUSA MOURA

**ATIVIDADE DE ANTÍGENOS (DE EXCREÇÃO E SECREÇÃO) DE
EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV UTILIZANDO
ELISA *IN HOUSE***

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 Infecciosas*.

Orientador: Prof. Dr. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

Coorientador: Dr Adriano Gomes da Silva

MANAUS

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

M929aa Sousa Moura, Emily de
ATIVIDADE DE ANTÍGENOS (DE EXCREÇÃO E
SECREÇÃO) DE EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma*
cruzi TcI e TcIV UTILIZANDO ELISA IN HOUSE /
Emily de Sousa Moura. Manaus: 2023. 87 f.

Dissertação (Mestrado) - PGGMT – Pós graduação em
medicina Tropical. Mestrado em Doenças Tropicais e
Infecciosas - Universidade do Estado do Amazonas,
Manaus, 2023. Inclui bibliografia
Orientador (a): Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

1. Sorologia. 2. Teste. 3. Diagnóstico. 4. TcI, TcIV.
I. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra (Orient.).
II. Universidade do Estado do Amazonas.
III. ATIVIDADE DE ANTÍGENOS (DE EXCREÇÃO E
SECREÇÃO) DE EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*
TcI e TcIV UTILIZANDO ELISA IN HOUSE

FOLHA DE JULGAMENTO

**ATIVIDADE DE ANTÍGENOS (DE EXCREÇÃO E SECREÇÃO) DE
EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV UTILIZANDO
ELISA *IN HOUSE***

EMILY DE SOUSA MOURA

“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. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, Dra.

Prof. Edson Junior do Carmo, Dr.

Prof. Zanair Soares Vasconcelos, Dr.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por toda a oportunidade que colocou em meu caminho.

Agradeço a minha orientadora, a Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, por ter me aceitado no grupo Chagas-Leish e por toda a paciência durante o meu trajeto. A senhora é um exemplo de mulher tendo a sua dedicação na pesquisa, profissional e sobretudo na sua família.

Agradeço a Msc. Susan Smith Doria que além de amiga, é a minha parceira de bancada, sempre dedicada a me ensinar todos os dias com toda a sua paciência e dedicação. É a pessoa no qual eu posso contar nos piores dias de laboratório.

Ao meu coorientador o Dr. Adriano Gomes da Silva, muito obrigada por todos os conselhos durante o projeto.

Agradeço ao meu esposo, Alejandro Novoa Caldas, por todo o apoio, força e compreensão durante a minha trajetória no mestrado, sendo a minha maior torcida.

Agradeço a todos da Unidade de Entomologia Médica Nelson Ferreira Fé da Fundação de Medicina Tropical (UENFF-FMT), especialmente, a Dona Yolanda Freitas Noguth por todos os seus ensinamentos sobre a cultura.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo, a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento do projeto.

Agradeço à Fundação de Medicina Tropical Dr. Hietor Vieira Dourado, a Universidade do Estado do Amazonas, a Superintendência da Zona Franca de Manas (SUFRAMA), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Pós-graduação de Medicina Tropical por sua dedicação e atenção com todos os alunos, e a coordenadora do programa, Dra. Gisely Cardoso de Melo à aos professores do PPGMT.

Aos meus amigos do laboratório e do PPGMT, especialmente para Izabele de Souza Guimarães, Matheus Martins Monteiro, Arineia Soares da Silva, Débora Raysa Teixeira de Souza, Jessica Vanina Ortiz, Layla Kelre Magalhães e Rubens Celso Andrade da Silva Junior que sempre estiveram ao meu lado durante a minha trajetória acadêmica.

Agradeço aos meus pais por toda a força que me deram durante toda a minha vida, pois sem eles não estaria aqui.

In memoriam de Nelson Ferreira Fé, por sempre me acompanhar desde a iniciação científica e compartilhar seu amor pela entomologia médica.

In memoriam de Denison Vital Jesus, por ser um grande amigo e nos alegrar em todos os momentos, compartilhando toda a sua criatividade e amor pela ciência.

A todos os que contribuíram, muito obrigada

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Esta pesquisa recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPPEAM através do Programa Universal e 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.

O projeto foi apoiado pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por meio de bolsa de estudo, durante os 24 meses de sua execução

RESUMO

A doença de Chagas-DC, parasitose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é transmitida ao homem de diversas formas, podendo se manifestar em uma fase aguda (DCA), diagnosticada por exames parasitológicos, e uma crônica (DCC), através de diagnóstico sorológico, sendo obrigatório a reatividade em pelo menos 2 testes, com princípios diferentes. Geralmente há divergência nos resultados, principalmente em casos da DCC da Amazônia e acredita-se que entre os motivos esteja o uso de testes produzidos com antígenos de *T. cruzi* não encontrados nessa região. O objetivo desse estudo foi investigar a atividade dos antígenos de excreção e secreção das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* DTU TcI e TcIV utilizando ELISA in house. O estudo foi realizado na Unidade de entomologia Nelson Ferreira Fé da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado. Os antígenos de excreção e secreção de isolados de *T. cruzi* TcI e TcIV de humanos com a DCA, foram testados em soros de pacientes positivos e negativos para DC, e soro de pacientes negativos para DC com histórico de leishmaniose, pelo método ELISA-in house. Foram testadas 113 amostras de soros divididas em 4 grupos com perfis clínico laboratoriais diferentes, sendo 32 (28,3%) soros do G1; 64(56,6%) do G2; 7(6,1%) do G3 e 10 (8,8%) do G4. Com exceção das amostras de soro do G3 todas apresentaram reatividade sendo no G1 22(68,7%) amostras testadas com antígeno de TcI, e 16 (50%) de TcIV; no G2 16 (25%) com antígenos de TcI e 15(23,4%) de TcIV e no G4 7 (70%) foram reativas em ambas as linhagens. Nas médias foi observado que existe diferença significativa entre os resultados de reatividade dos soros de pacientes positivos e negativos para DC e em soros de pacientes com histórico de leishmaniose. A reatividade das duas linhagens de *T. cruzi* em amostras positivas para DC responde aos objetivos propostos, entretanto mais estudos são necessários sobre esses antígenos e a possibilidade de seu uso em testes sorológicos para o diagnóstico da doença de Chagas, particularmente na Amazônia, considerando a ocorrência de outras doenças que resultam em reatividade cruzada.

Palavras-chaves: Sorologia; teste; diagnóstico; TcI, TcIV

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi*, transmitted to humans through different pathways, and can manifest itself in an acute phase (ACD), diagnosed by parasitological tests, and a chronic phase (DCC), through serological diagnosis, in which the reactivity in at least 2 tests, with different principles, is mandatory. There is generally divergence in results, especially in cases of CCD in the Amazon and it is believed that one of the reasons is due the use of tests produced with *T. cruzi* antigens not found circulating in this region. The aim of this study was to investigate the activity of excretion and secretion antigens of DTU TcI and TcIV *Trypanosoma cruzi*-epimastigotes using in-house ELISA. The study was carried out at the Nelson Ferreira Fé Entomology Unit of the Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado. The excretion and secretion antigens of *T. cruzi* TcI and TcIV isolates from humans with ACD were tested in sera from patients positive and negative for ACD, and serum from patients negative for ACD with a history of leishmaniasis, by the in-house ELISA method. A total of 113 serum samples were tested, 32 (28,3%) sera from G1; 64 (56,6%) from G2; 7 (6,1%) from G3 and 10 (8,8%) from G4. With the exception of serum samples from G3, all showed reactivity, 22 (68.7%) samples tested with TcI antigen in G1, and 16 (50%) with TcIV; in G2 16 (25%) with TcI antigens and 15 (23.4%) with TcIV and in G4 7(70%) were reactive in both lineages. In the means comparison, it was observed that there is a significant difference between the reactivity results of sera from patients positive and negative for CD and in sera from patients with a history of leishmaniasis. The reactivity of the two *T. cruzi* strains in CD-positive samples responds to the proposed objectives. However, more studies are needed on these antigens and the possibility of their use in serological tests for the diagnosis of Chagas disease, particularly in Amazonia, considering the occurrence of other diseases that result in cross-reactivity.

Keywords: Serology; test; diagnosis; TcI, TcIV

RESUMO LEIGO

A doença de Chagas, é um importante problema de saúde, porque pode causar danos graves ao coração de uma pessoa doente, sendo responsável por milhares de mortes em vários países. Pode ser transmitida ao homem pelo contato com as fezes de insetos conhecidos como barbeiros, ou recebendo sangue e órgãos doados por alguém contaminado, pode ser transmitida da mãe pro bebê durante a gestação ou parto e pelo consumo de alimentos contaminados como o açaí. É uma doença que afeta pessoas de regiões rurais com dificuldade para o acesso aos serviços de saúde. Quando a pessoa se infecta ela pode ou não apresentar sintomas tanto no início ou ano depois da transmissão. Na Amazônia tem crescido o número de pessoas com essa doença, principalmente com história de terem tomado o açaí. Também há casos de pessoas que descobrem ter essa doença após tentarem doar sangue ou ainda por sentirem problemas como fadiga, cansaço, e palpitação no coração. Seu diagnóstico, é feito por exame de sangue. Os testes realizados para o diagnóstico se observam diferenças nos resultados. Acredita-se que essas diferenças sejam causadas pelo uso de testes produzidos com *T. cruzi*, que ainda não foi identificado nessa região. Nesse sentido acredita-se que metodologia para testes sorológicos usando linhagens de *T. cruzi* isolados de pessoas que contraíram a DC, nessa região, precisam ser produzidos tendo em vista a possibilidade de obtenção de resultados no diagnóstico de pessoas portadoras da doença crônica, sem sintomas, e que não sabem de sua condição de saúde.

LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1. Mapa da distribuição de casos da doença de Chagas em 2018 no mundo. Fonte: Who, 2018	1
Figura 2. Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fonte: Ortiz, 2019.....	3
Figura 3. Distribuição espacial das linhagens (DTUs) de <i>Trypanosoma cruzi</i> nas Américas Central e Sul. Imagem de Brèniere, 2016 & Zingales, 2017, modificada por Ortiz, 2018.....	4
Figura 4. Fluxograma das etapas do diagnóstico laboratorial da infecção por <i>T. cruzi</i> na fase crônica, em casos suspeitos de doença de Chagas crônica. Adaptado, Dias et al., 2016.....	9
Figura 5. Casos de DCA registrados no Amazonas entre 1977 a 2021. Fonte: E- book. Doença de Chagas: aspectos gerais, emergência na Amazônia e orientações sobre o atendimento de pacientes no estado do Amazonas	12

LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO-ARTIGO

Figura 1. Fluxo de trabalho para obtenção dos antígenos e posterior testagem da atividade antigênica	22
Figura 2. Médias das densidades óticas, das análises dos grupos de soros positivos para DC (POS: POSITIVOS), do soro negativo para DC (NEG: NEGATIVOS) e o grupo de soros negativos para DC junto com os soros de pacientes com Leishmaniose (NEG+LEISH)	28
Figura 3. Imagem da curva ROC gerada nos diferentes grupos de soros e antígenos avaliados. A. Antígenos de TcI B. Antígenos de TcIV	29

LISTA DE TABELAS DO MANUSCRITO-ARTIGO

Tabela 1. Descrição dos resultados da atividade antigênica de T. cruzi DTUs TcI e TcIV em amostras de soro por grupo avaliado.....	26
Tabela 2. Descrição dos resultados da reatividade do soro com antígenos de T. cruzi DTUs TcI e TcIV em amostras de soro do grupo 1	27

LISTA DE QUADROS DO MANUSCRITO-ARTIGO

Quadro 1. Modelo da placa com a padronização das concentrações	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

µg:	micrograma
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
mL:	mililitro
nm:	nanômetros
OMS:	Organização Mundial da Saúde
OPD:	O-Fenilenodiamina
PBS:	buffer de fosfato
SFB:	Soro fetal bovino
x g:	Força centrífuga
PBS:	Phosphate-Buffered Saline
OPAS:	Organização Pan-Americana da Saúde
HCL2N:	Ácido clorídrico 2N

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas aspectos gerais	1
1.2 Agente etiológico	2
1.2.1 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro vertebrado.....	2
1.2.2 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro Invertebrado	2
1.2.3 Diversidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.2.4 Interação parasito-hospedeiro	5
1.3 Formas de transmissão da DC ao homem	6
1.4 Manifestações clínicas da doença de Chagas	6
1.4.1 Fase Aguda	6
1.4.2 Fase crônica.....	6
1.5 Diagnóstico da DC	7
1.5.1 Diagnóstico na fase aguda - DCA	7
1.5.2 Diagnóstico na fase crônica - DCC	7
1.5.3 Métodos de diagnóstico sorológico.....	8
1.5.3.1 Ensaio imunoenzimático – ELISA.....	8
1.5.3.2 Hemaglutinação (HAI)	9
1.5.3.3 Imunofluorescência (IFI).....	10
1.5.3.4 Western blot	10
1.6 Doença de Chagas na Amazônia	10
1.6.1 Doença de Chagas no Amazonas	11
1.6.2 Doença de Chagas no alto Rio Negro	12
1.6.2.1 Inquéritos sorológicos realizados no Amazonas.....	13
1.6.2.2 Dificuldades no uso de métodos sorológicos.....	14
1.7 Uso de antígenos nos métodos de diagnóstico da doença de Chagas	15
1.7.1 Antígenos de excreção e secreção.....	15
1.8 Notificação dos casos crônicos	16
1.9 Relevância	16
2. OBJETIVOS	18

2.1 Geral:	18
2.2 Específicos:.....	18
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	19
4. CONCLUSÃO	38
5. LIMITAÇÕES E RECOMENDAÇÕES	39
6. REFERÊNCIAS	40
7. ANEXOS	50
7.1 Western blot in-house	50
7.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido -TCLE.....	51
7.3 Procedimentos operacionais padrão utilizados na dissertação.....	53
7.3.1 Procedimento para preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle para cultura de Leishmania sp. e <i>T. cruzi</i>	53
7.3.2 Procedimento para obtenção de massa parasitária de <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
7.3.3 Procedimento para obtenção dos antígenos de excreção e secreção de <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
7.3.4 Procedimento para preparação de PBS 1x	60
7.3.5 Procedimento para a preparação de tampão de bloqueio para o uso em ELISA.	62
7.3.6 Procedimento para preparação de Tampão de carbonato para o uso em ELISA.	64
7.3.7 Procedimento para preparação de Tampão de lavagem para o uso em ELISA	66
7.3.8 Procedimento para preparação do Tampão do OPD	68
7.4 Parecer do CEP	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas aspectos gerais

A Doença de Chagas – DC é uma parasitose originária das Américas que afeta populações com acesso limitado aos serviços de saúde causando um grande impacto socioeconômico (1–3).

Descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, nas últimas décadas, as migrações humanas não controladas, degradação ambiental, alterações climáticas, maior concentração da população em áreas urbanas e precariedade de condições socioeconômicas, inserem-se como determinantes e condicionantes sociais para a transmissão de *T. cruzi* ao homem, dispersando a doença para outros países entre eles, os Estados Unidos, Canadá, Europa, Japão e Austrália (Figura 1). Estima-se que atualmente, 6 a 8 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas representando um desafio em termos de saúde pública (4,5,6).

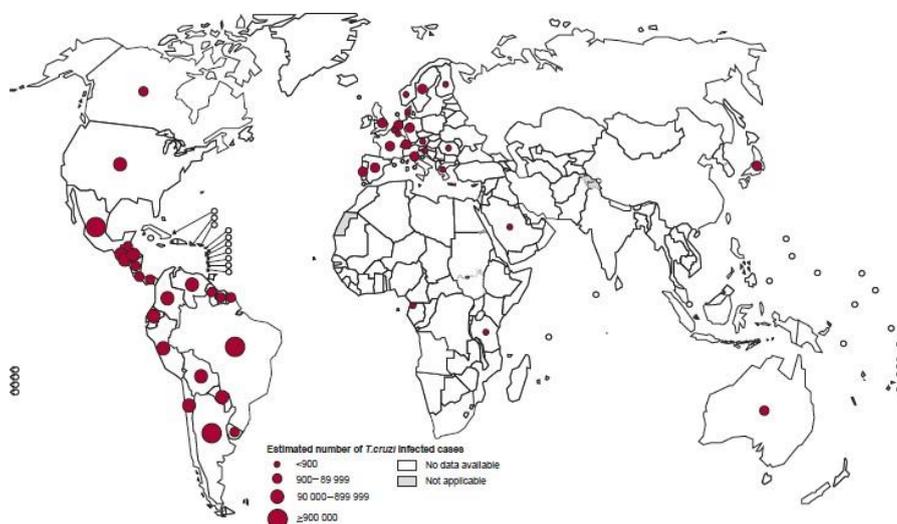


Figura 1. Mapa da distribuição de casos da doença de Chagas em 2018 no mundo. Fonte: Who, 2018

1.2 Agente etiológico

A DC é causada pelo *Trypanosoma cruzi* um protozoário flagelado do grupo Stercoraria, Classe Kinetoplastida, Família Tripanosomatidae. Possui um ciclo de vida complexo do tipo heteróxico, realizado em diversos hospedeiros (vertebrados e invertebrados), passando por diferentes formas evolutivas, denominadas de tripomastigota sanguínea e amastigota encontradas em hospedeiros vertebrados (7,8), e as formas tripomastigota metaciclística e epimastigotas no hospedeiro invertebrado (inseto vetor - triatomíneo). É um parasito de ciclo de vida complexo desenvolvido em dezenas de espécies de animais vertebrados e invertebrados.

1.2.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado

Dezenas de espécies de mamíferos das ordens: Didelphimorphia, Lagomorpha, Chiroptera, Rodentia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata, Perisodactyla, podem ser utilizadas com hospedeiras do *T. cruzi*, e cada espécie infectada, desempenha um importante papel na manutenção do ciclo biológico do parasito. O homem é inserido nesse processo pela interação entre ciclos realizados em ambientes domésticos, peridoméstico e silvestre (9–11).

Nesses hospedeiros, o ciclo se inicia quando o parasito cai na corrente sanguínea e alcança macrófagos de células teciduais, onde se multiplica por divisão binária, se diferencia em formas amastigotas, e posteriormente em novas tripomastigotas, podendo ficar por algum tempo na corrente sanguínea ou alcançar e infectar novas células de vários tecidos (8,11,12) (Figura 2).

1.2.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro Invertebrado

Os hospedeiros invertebrados do *T. cruzi* são insetos hematófagos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, conhecidos como barbeiro. Possuem desenvolvimento hemimetabolo, realizado em três estágios: ovo-ninfas(I-V) -adultos, necessitando do repasto sanguíneo para fazer a muda e durante a fase adulta. Atualmente são conhecidas 157 espécies descritas (incluindo duas fosseis), agrupadas em 18 gêneros, dos quais, três: *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* têm

importância médica (13,14). No Brasil há registro de 65 espécies, dos quais 25 já foram encontradas na Amazônia. *Rhodnius picticipes*, *Rhodnius robustus* e *Panstrongylus geniculatus* são as espécies vetores predominantes, reportando-se uma taxa de infecção entre 30-50% (10,15).

Ao realizar a hematofagia em um mamífero infectado os triatomíneos podem ingerir as formas tripomastigotas sanguíneas e se infectar. No intestino médio ocorre a diferenciação das formas ingeridas em esferomastigotas, e epimastigotas, que ao chegar no final do tubo digestivo, na ampola retal se transforma em tripomastigotas metacíclicas. Ao serem eliminadas pelas fezes durante um novo repasto sanguíneo, podem infectar um novo hospedeiro e começar um novo ciclo de infecção (11,16,17) (Figura 2).

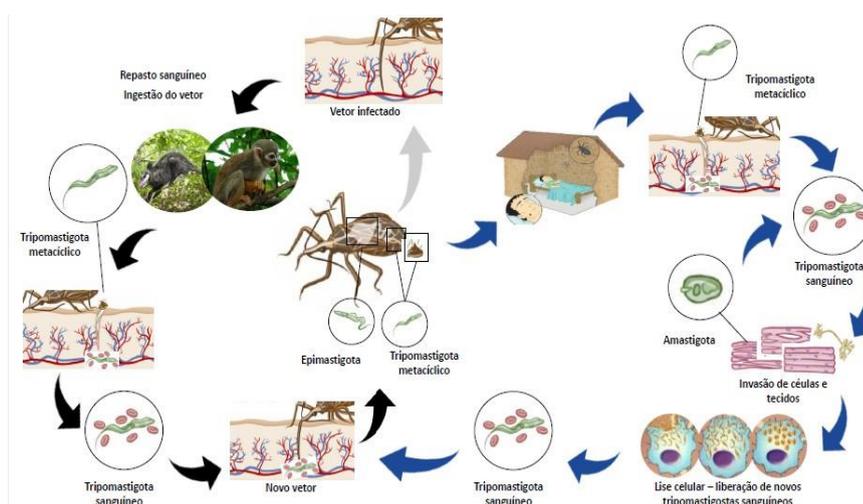


Figura 2. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Ortiz, 2019

1.2.3 Diversidade genética do *Trypanosoma cruzi*

A capacidade infectiva do *Trypanosoma cruzi* em diversas espécies de hospedeiros, resulta em populações naturais com diversidade genética, taxonomia difícil e risco de identificação errônea. A falta de métodos padronizados de tipagem molecular e uso de nomenclaturas alternativas (biodemas, zimodemas, clones, esquizodemas e unidades de tipagem discreta-DTUs), entre outros, tem gerado confusão na propostas de grupos (18).

A primeira abordagem aplicada no estudo da variabilidade molecular do *T. cruzi*, foi realizada através da análise de isoenzimas, técnica que demonstrou distintas populações, denominadas de zimodemas, sendo os descritos no Brasil os zimodemas Z1, Z2, Z3, ZB, ZC E ZD(18–20).

Após anos de estudos, especialistas chegaram a um consenso e definiram uma proposta de nomenclatura intraespecífica de *T. cruzi*. Em 2009, considerando vários fatores e critérios, entre outros, a distribuição geográfica, ciclo de transmissão, doença causada, foram reconhecidas seis linhagens genéticas denominadas de unidades de tipagem discretas (DTU), classificadas em grupos de TcI a TcVI e Tcbat, DTU detectada primariamente em morcegos, registrada em um caso humano (Figura 3) (21–25).

Velásquez-Ortiz e colaboradores (26), demonstraram a distribuição geográfica das DTUs (Figura 3) principalmente em países como Brasil, Colômbia, Bolívia, Chile e Argentina, detectadas em diferentes espécies de hospedeiros e/ou vetores.

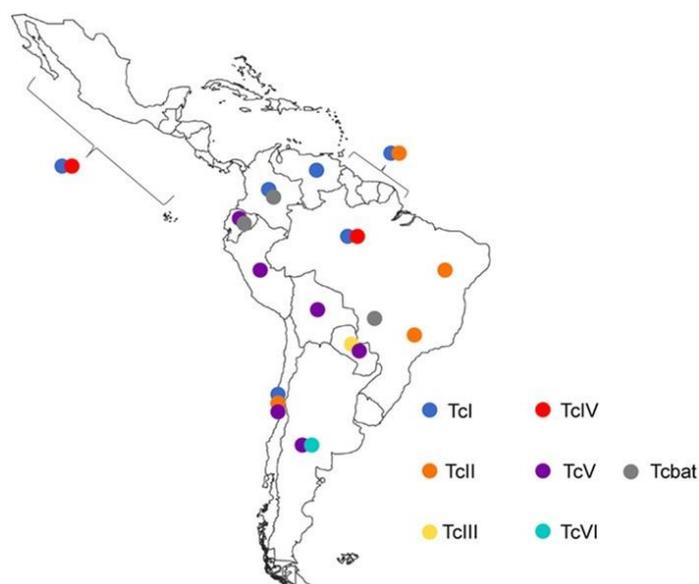


Figura 3. Distribuição espacial das linhagens (DTUs) de *Trypanosoma cruzi* nas Américas Central e Sul. Imagem de Brèniere, 2016 & Zingales, 2017, modificada por Ortiz, 2018.

1.2.4 Interação parasito-hospedeiro

Durante o curso da infecção, as diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* excretam e secretam, uma variedade de moléculas de membrana no meio em que vivem, através de um mecanismo conhecido como “shedding”, funcionando como escape do parasito ao sistema imune do hospedeiro (27).

Nos estudos de interação entre células hospedeiras e *T. cruzi*, deve-se considerar: 1) a cepa de *T. cruzi* utilizada 2) a forma evolutiva (no caso de uso da tripomastigota se a forma é fina ou larga); e 3) o tipo de célula hospedeira. Para ter sucesso na infecção, o processo de invasão é o primeiro passo da interação parasito-hospedeiro. Entretanto, os mecanismos de reconhecimento, sinalização e invasão (ou fagocitose) de *T. cruzi* com células hospedeiras são complexos, pois participam diversas moléculas de interesse (28). Quando o *T. cruzi* invade a matriz extracelular e/ou células hospedeiras para se diferenciar na forma replicativa, utiliza vários fatores de excreção/secretoma e de ligantes a membrana do hospedeiro (29).

Isso ocorre pela complexidade da superfície celular do parasito composta principalmente de glicoproteínas e glicolípídeos e isso se reflete em uma variedade de funções realizada pela sua membrana, incluindo desde ataque e penetração da célula hospedeira até a resistência aos mecanismos de defesa tanto no intestino médio dos insetos quanto nas células do hospedeiro vertebrado (28).

Para realizar essa internalização na célula hospedeira, o *T. cruzi* sintetiza o ácido siálico (monossacarídeo) que atua como uma molécula moduladora do processo de adesão. A partir dessa síntese, o parasito expressa uma super família de glicoproteínas conhecidas como transialidases, enzimas capazes de catalisar a transferência do ácido siálico de glicoconjugados a moléculas “like” mucinas localizadas na membrana da sua superfície, podendo agir também como ligantes de superfície celular, no qual estão envolvidas em processos de disparo de sinalização e funcionando como antígeno gerando o reconhecimento da célula hospedeira. A importância desse processo é indicada pelo fato de *T. cruzi* ter centenas de genes codificando as transialidases e mucinas do tipo proteína (30–32).

1.3 Formas de transmissão da DC ao homem

O homem pode se tornar portador do *T. cruzi* de diversas formas sendo a transmissão tradicional a vetorial, em áreas onde o vetor estabelece colônias dentro do domicílio. Outras formas também podem ocorrer tais como a transfusional, transplante de órgãos, congênita e oral. Atualmente, o mecanismo oral de transmissão, que ocorre, principalmente, por meio da ingestão de alimentos contaminados com as formas infectantes do parasito, representa a via de contágio mais comum e constitui cerca de 70% dos casos agudos diagnosticados no Brasil (33–37)

1.4 Manifestações clínicas da doença de Chagas

Após um período de incubação do parasito, o homem pode apresentar ou não sintomatologia, classificando a doença, em duas fases: aguda (DCA) e crônica (DCC).

1.4.1 Fase Aguda

A fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia da doença com duração de 3-8 semanas. Nos casos sintomáticos com suspeita de transmissão vetorial, podem ser observados sinais de porta de entrada do parasito tais como o chagoma de inoculação ou o sinal de Romana. Outros sintomas inespecíficos como febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, miocardites e meningoencefalites nos casos mais severos podem ocorrer e serem confundidos com outras doenças (3,38,39).

Cerca de 50-60% dos casos no Brasil, são assintomáticos e destes 2-4% evoluem para fase crônica da doença podendo desenvolver miocardiopatias, e problemas gastroenterológicos representando as formas mais grave dessa doença, (40–42).

1.4.2 Fase crônica

A fase crônica é caracterizada pela diminuição da parasitemia a níveis sub-patentes, induzida pela resposta imunológica do indivíduo, onde a grande maioria dos

casos não apresenta sintomas ou exames clínicos alterados. Assim, o portador da DCA pode evoluir para a fase crônica, e se permanecer assintomático, é caracterizada a fase crônica indeterminada da DC podendo persistir por toda a vida do indivíduo, ou se manifestar-se nas cardiopatias, associada à insuficiência cardíaca, arritmias, tromboembolismo periférico e morte súbita (43). Pode ainda, manifestar sintomas gástricos no esôfago e colón que se apresentam normais (39,44–47).

1.5 Diagnóstico da DC

O diagnóstico clínico é evidenciado pelos aspectos epidemiológicos e/ou laboratoriais. No diagnóstico laboratorial, os exames serão específicos, de acordo com a fase da doença (3,40,48,49).

1.5.1 Diagnóstico na fase aguda - DCA

Em razão da parasitemia evidente, nessa fase recomendam-se métodos parasitológicos diretos, de procedimento rápido e simples, e boa sensibilidade, tais como, a gota espessa que é considerada o padrão ouro ou esfregaço, no reconhecimento das formas tripomastigotas circulantes no sangue (40,50,51). Entretanto, em casos de baixos níveis de parasitos circulantes no sangue periférico, podem ser empregados métodos de concentração (método Strout ou micro-hematócrito) que proporciona maior sensibilidade, recomendados em pacientes com forte suspeita de DCA com exames diretos negativos (51).

Além do diagnóstico parasitológico existem técnicas sorológicas indiretas de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM (52).

1.5.2 Diagnóstico na fase crônica - DCC

A fase crônica é caracterizada pela baixa parasitemia na corrente sanguínea e aumento da produção de imunoglobulina do tipo IgG anti-*T. cruzi*, os quais passam a ser detectados principalmente por ensaio sorológicos. Nesta fase podem ser empregada também testes parasitológicos indiretos, como xenodiagnóstico e a hemocultura para a averiguação da presença ou ausência de parasitos (3,53).

Os critérios da OMS para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas crônica recomendam o uso de dois testes sorológicos baseados em conjuntos de antígenos distintos, e essa recomendação é seguida no último informe da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (3,54). Em caso de discordância, um terceiro teste deve estar disponível (55).

1.5.3 Métodos de diagnóstico sorológico

Várias técnicas sorológicas foram desenvolvidas para o diagnóstico da DCC (Figura 4), as mais utilizadas são o ensaio de imunoenzimático (ELISA), a hemaglutinação indireta (HAI), o teste de imunofluorescência indireta (IFI) e Western blotting (WB) (53,56).

1.5.3.1 Ensaio imunoenzimático – ELISA

Em 1975, Voller e colaboradores descreveram o ELISA para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas e que ao longo do tempo passou por aperfeiçoamento e atualmente é utilizado na rotina dos serviços de hemoterapia e diagnóstico. Esse teste imunoenzimático se baseia na interação antígeno-anticorpo revelada por um cromógeno ativado pela reação específica entre enzima e substrato (57).

A maioria dos kits para testes ELISAs disponíveis comercialmente emprega antígenos de epimastigotas inteiros ou frações de epimastigotas (extratos de antígenos recombinantes e/ou peptídeos sintéticos) (58). No entanto a falta de antígenos específicos e caracterizados podem gerar resultados contraditórios, dificultando o diagnóstico da DC, sendo necessário à procura de melhores antígenos (59).

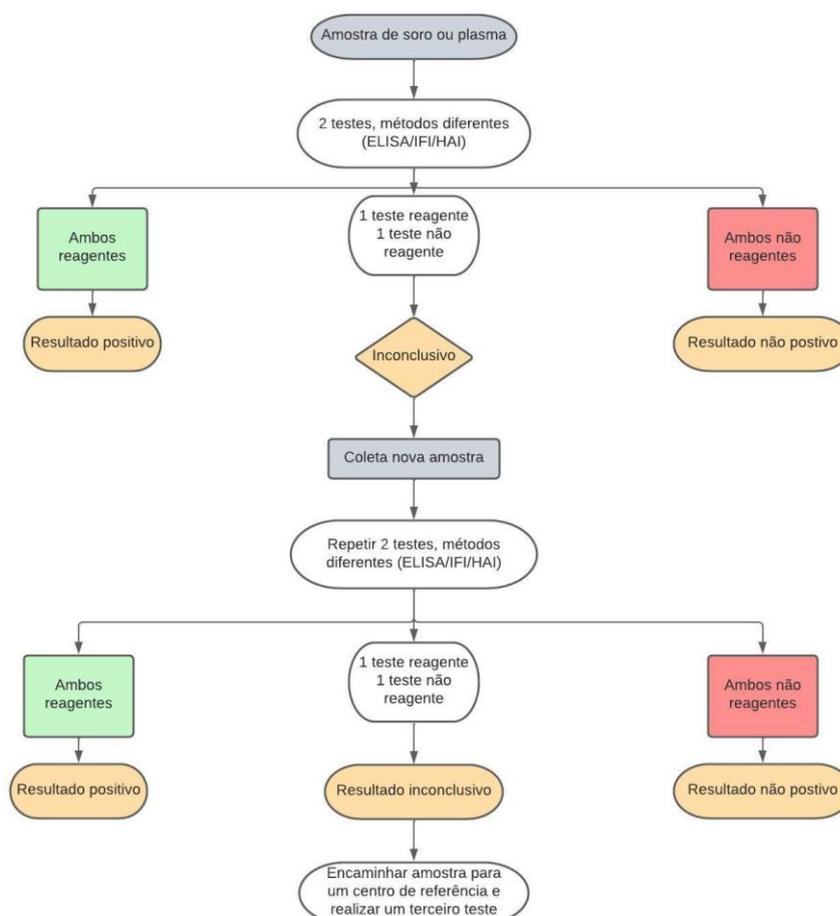


Figura 4. Fluxograma das etapas do diagnóstico laboratorial da infecção por *T. cruzi* na fase crônica, em casos suspeitos de doença de Chagas crônica. Adaptado, Dias et al., 2016

1.5.3.2 Hemaglutinação (HAI)

A HAI consiste, na aglutinação de hemácias de carneiro, recobertas com antígenos citoplasmáticos de *T. cruzi* na presença de soro com anticorpos contra o parasito (48).

Existindo anticorpos contra o *T. cruzi*, os mesmos formam ligações entre as hemácias, interagindo com os antígenos na superfície. O que resulta na formação de um mano nas placas de microtitulação. Devido ao seu baixo custo e facilidade de execução, este teste tem sido bastante utilizado no diagnóstico sorológico. No entanto, apesar de apresentar alta positividade, podem ocorrer reações cruzadas com outros parasitos, principalmente leishmaniose (60).

1.5.3.3 Imunofluorescência (IFI)

No ensaio de IFI ocorre quando o anti-IgG humana é marcado com fluoresceína e detecta a presença do parasito pela leitura em microscópio (52,61). Entretanto esse teste, apesar de ter numa sensibilidade de 99%, possui alguns problemas no momento da leitura do resultado, como, a execução por um técnico especializado, necessidade de um microscópio de luz UV especial e bons ajustes no equipamento para minimizar os erros. Como também possui baixa especificidade da técnica podendo gerar reações cruzadas com outros parasitos (61).

1.5.3.4 Western blot

Em WB nesta técnica o antígeno de *T. cruzi* é submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida para resolução das proteínas, segundo o critério de massa molecular, ocorrendo separação e diferenciação por peso, seguida da transferência dos antígenos para uma membrana, no qual ocorre uma reação imunoenzimática com detecção de bandas proteicas específicas do parasito (62,63).

1.6 Doença de Chagas na Amazônia

A Amazônia brasileira, foi por muito tempo, considerada uma área livre da DC, embora, nessa região, desde 1924, já se conhecia a ocorrência do *T. cruzi* em um ciclo silvestre (64). Em 1969, em Belém no Pará, os primeiros casos agudos foram registrados em quatro pessoas de uma mesma família, sem relato da presença de triatomíneos no intra, peri e extra domicílio, suspeitando-se de transmissão oral (65). Ao longo dos anos casos foram registrados em outros estados, sendo a DC reconhecida como importante antropozoonose negligenciada (66–71). Entretanto, o parasito é mantido em um ciclo silvestre, causando doença no homem de forma acidental após exposição, onde a maioria são portadores da doença e não tem conhecimento dessa condição (34).

Entre 2007 e 2016 o Ministério da Saúde do Brasil contabilizou mais de 150 surtos, com registro em 33 municípios da região amazônica, apontando como a fonte

provável de infecção, a ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi* (72). Em 2020, segundo o boletim epidemiológico, do MS, 91.1% dos casos de DCA notificados a principal forma de transmissão foi a oral (15,72).

1.6.1 Doença de Chagas no Amazonas

No estado do Amazonas, os primeiros casos da DC foram reportados no ano de 1977 quando detectaram-se seis casos da doença de Chagas crônica (DCC) em extratores de piaçava no município de Barcelos (73). Em 1989 ocorreu o primeiro caso da DCA, em uma criança no município de São Paulo de Olivença (74).

Entre 2004 e 2022 ocorreram 10 surtos (Figura 5), da DCA relacionados à transmissão oral, onde cerca de 150 pessoas foram diagnosticadas (35,36,75–77). Casos isolados tem sido também detectado e notificado de forma precoce por microscopistas da vigilância da malária (78). Casos da DCC também tem sido registrados em inquéritos soropidemiológicos, triagem na doação de sangue, e em serviço de saúde no ambulatório de cardiologia na Fundação Hospital Francisca Mendes (42,79,80).

A linhagem TcI, tem sido identificada em casos da DC Aguda isolados, DC crônica indeterminados, e em vetores e reservatórios, relacionada ao ciclo silvestre do parasito (79,81). Outra linhagem que tem sido descrita nesse estado, é a TcIV identificada nas amostras de pacientes com a DC aguda em surtos por transmissão oral, predominantemente o açai (35), e mais recentemente TcIII (67) (Figura 5).

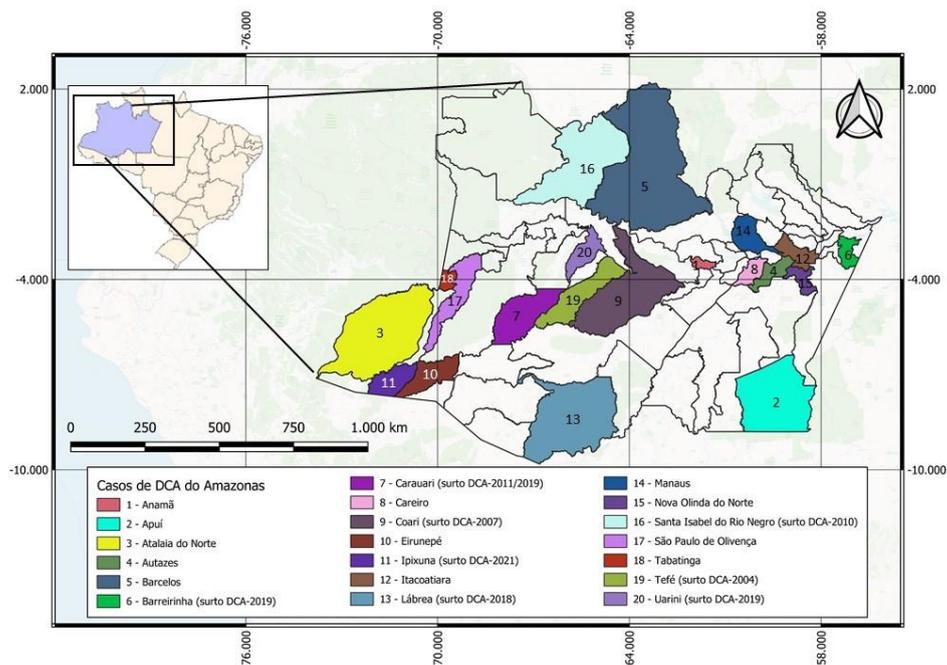


Figura 5. Casos de DCA registrados no Amazonas entre 1977 a 2021. Fonte: E- book. Doença de Chagas: aspectos gerais, emergência na Amazônia e orientações sobre o atendimento de pacientes no estado do Amazonas

1.6.2 Doença de Chagas no alto Rio Negro

Os municípios de Santa Isabel do Rio Negro e Barcelos são conhecidos pela grande atividade extrativista de piaçava (*Leopoldina piassaba*), espécie de palmeira que serve de habitat para a espécie de triatomíneo *Rhodnius brethesi*, vetor de *T. cruzi* resultando na exposição da população ao ciclo de transmissão. Foi em Barcelos que se registraram os primeiros casos de DC crônica através da sorologia (73)

No ano 2010 realizou-se um inquérito sorológico em Barcelos, e foram analisadas 4.880 amostras de sangue coletadas em papel filtro. Utilizou-se o kit IFF-Chagas (Biomanguinhos), e 221 (4,5%) amostras foram fortemente reativas enquanto 302 (6,2%) foram consideradas fracamente reativas. Em novas análises, 137 amostras de soro do grupo de pacientes fortemente reativos e 178 fracamente reativos, usando o Chagas kit, (Biomanguinhos). Dois kit de ELISA, o DMED kit e o ELISA recombinante (Wiener lab V3), se observou que 67/137 (48,9%) foram consideradas como divergentes por serem reativas em um teste e 33/137 (24,1%) foram consideradas como sororeativos (82). Do grupo de 178 amostras de reatividade

fraca, 79/178 (44,4%) foram divergentes e 10 (5,6%) foram sororeativos (82). Nessa mesma região foi realizado outro inquérito entre 2015-2016 nos trabalhadores da extração da piaçava e seus familiares, resultando em 25/482 (5,2%) amostras reativas confirmadas (83).

1.6.2.1 Inquéritos sorológicos realizados no Amazonas

Entre setembro 2007 e novembro 2008 realizou-se um inquérito sorológico em áreas rurais de Manaus, Coari e Tefé. Foram analisadas 1.263 amostras com a técnica de ELISA, das quais, 24 (1,9%) foram reativas e 10 (0,8%) foram inconclusivas; as 34 amostras foram submetidas ao teste de IFI e foi encontrado que 19 (1,5%) foram reativas com titulações de 1:40 – 1:80. Essas 19 amostras foram submetidas ao WB, e 15 (1,2%) foram reativos. A prevalência geral foi de 1,2% (15/1263), dos quais 0,9% são autóctones do estado. A prevalência de Manaus foi de 1,2%(7/545), em Coari de 0,5%(2/399) e em Tefé de 1,9%(6/319) (80).

Entre outubro de 2010 e junho de 2012 novo inquérito sorológico foi realizado em áreas periurbana e rural de Manaus, sendo coletadas 1.845 amostras de sangue da população. Todas as amostras foram submetidas a dois testes que estavam disponíveis no mercado, para o método de ELISA, 1) o kit “Chagas III ELISA Test Bioeasy”, sensibilizado com extratos totais das cepas de *T. cruzi*, Tulahuén e Mn, e 2) o kit “Imuno-Elisa Chagas Wama”, sensibilizado com antígeno recombinante. Foram encontradas 184/1.845 amostras reativas e 12 indeterminadas, e o 1º. kit obteve reatividade na maioria das amostras. As 196 amostras foram submetidas ao teste Imuno-CON diagnostic (IFI), e ao TesaBlot cruzi, e foi observado 42/196 (21,4%) foram reativas na IFI e 11/196 (5,6%) no TesaBlot. A prevalência encontrada no estudo foi de 2,4% (79) (dados ainda não publicados).

Entre 2017 e 2018 foi realizado um estudo em 45 pacientes com cardiopatia idiopática, as amostras de soro foram submetidas ao teste de ELISA (Chagatest ELISA recombinante v. 4.0, Wiener Laboratórios, Argentina) e ao teste de IFI (Imuno-CON Chagas, WAMA Diagnostica, Brazil), e no caso de resultados divergentes, essas amostras foram submetidas ao TESA-blot, e à detecção molecular de *T. cruzi*. Foram encontradas 14 amostras divergentes, todas com resultado negativo no TESA-blot, no

entanto, 2 delas foram positivas na análise molecular (47), se observando que os kits de ELISA, IFI e WB, apresentaram divergências nos resultados, dificultando o diagnóstico. É provável que essas divergências possam estar associadas ao antígeno de *T. cruzi* utilizado nos kits comerciais (59,84,85).

Além disso, há o problema da especificidade, principalmente à reatividade cruzada relacionada aos antígenos de outros parasitos como o caso de *Leishmania* sp, eventualmente gerando resultados falso-positivo ou inconclusivos, dificultando a interpretação do diagnóstico. Entre os fatores que podem influenciar nesses resultados está o estágio do parasito no momento da obtenção o antígeno (epimastigota, tripomastigota ou amastigota) ou a preparação do antígeno. Em caso de resultados inconclusivos ou discordantes, é preciso de uma terceira técnica ou amostra adicionais, isso gera o aumento do custo do diagnóstico. É importante destacar que os testes sorológicos utilizados têm protocolos distintos e desempenho variável. Testes definidos como convencionais, usam antígenos do parasito ou o parasito total, e os não convencionais usam proteínas recombinante. (49,86–88).

1.6.2.2 Dificuldades no uso de métodos sorológicos

A região Amazônica possui características que a colocam em risco para a transmissão do *T. cruzi*, como a presença de reservatórios e do vetor envolvidos no ciclo, o desmatamento que altera o ecossistema de triatomíneos obrigando-os a procurar outras fontes de alimento, a imigração de portadores da DC de áreas endêmicas, e a falta de conhecimento da população sobre a DC, resultando em sua inserção no ciclo de transmissão do parasito, não manifestando sintomas no período que caracteriza a fase aguda consequentemente evoluindo para a fase crônica sem saber de sua condição de saúde. Nesse contexto os inquéritos sorológicos e a vigilância epidemiológica são de grande relevância nessa região (80,83,89,90).

1.7 Uso de antígenos nos métodos de diagnóstico da doença de Chagas

Deve-se considerar a linhagem de *T. cruzi* que atualmente está classificados em 7 genótipos diferentes. Os resultados discordantes podem ter relação com as diferenças antigênicas entre proteínas recombinantes ou DTUs de *T. cruzi*. Atualmente os kits comerciais disponíveis são produzidos com linhagens do tipo TcII (principalmente), TcV e TcVI, genótipos ainda não encontrados na Amazônia, sendo recomendadas técnicas *in house* no diagnóstico (22,91–94).

As grandes dificuldades operacionais e de locomoção, a miscigenação de agravos e múltiplos elementos antigênicos, o ambiente mutante e vários fatores geopolíticos complicam sobremaneira a realização de um diagnóstico claro da situação da DC na Amazônia. Aliado a tudo isso está o fato de que a doença de Chagas é pouco conhecida, porque não há vetores colonizando os domicílios. Nesse contexto a pesquisa deve ser considerada como prioridade e imprescindível nos países integrantes da região (90)

1.7.1 Antígenos de excreção e secreção

O *T. cruzi* possui antígenos potentes em sua estrutura chamados de antígenos de excreção e secreção, liberados no ambiente que se encontram, provavelmente envolvidas na disseminação do parasito e na resistência às defesas imunológicas do hospedeiro (50).

Em 1965, Tarrant e colaboradores, fizeram o primeiro relato de exoantígenos em *T. cruzi* mostrando a existência de antígenos sorologicamente ativos no meio de cultura do *T. cruzi*. O estudo revelou um complexo de substâncias (possivelmente uma glicoproteína), um exoantígeno, e não simplesmente um antígeno somático, liberado como resultado da lise ou quebra do *T. cruzi* morto (95).

Atualmente utiliza-se a produção de antígenos de excreção e secreção de tripomastigotas (TESA), porém, a produção requer instalações de cultura de células adequadas e outras infraestruturas que nem sempre estão disponíveis para locais

com pouco recurso. Muitos laboratórios utilizam antígenos de excreção e secreção de epimastigotas pela facilidade de obtenção e alto rendimento dos antígenos (96).

A OMS (Organização Mundial de Saúde) enfatiza a necessidade de antígenos definidos para melhorar o sorodiagnóstico da doença de Chagas. Na tentativa de resolver este problema, vários grupos de pesquisa têm utilizado antígenos recombinantes e/ ou sintéticos e purificados bioquimicamente (58,97,98).

Para serem considerados úteis, esses antígenos devem atender aos seguintes critérios: (i) devem estar presentes em isolados de *T. cruzi* de diferentes áreas de endemicidade e ausentes em outros agentes de doenças infecciosas; (ii) devem ser altamente imunogênicos em populações com diferentes backgrounds imunogenéticos, independentemente da fase clínica da doença de Chagas; (iii) devem ser estáveis e facilmente passíveis de testes de controle de qualidade, para garantir a reprodutibilidade (99,100).

1.8 Notificação dos casos crônicos

Em 2020, a doença de Chagas crônica foi definida como uma doença de notificação compulsória nacionalmente, e encontra-se em processo de estruturação a sistematização dos dados dos casos. Assim, permanece a limitação de fontes de dados atuais para construção de indicadores para doença de Chagas crônica(101)

Portanto, demonstra-se a importância de esforços para articulação das ações de vigilância em saúde, com envolvimento multissetorial, principalmente no eixo da participação efetiva da rede assistencial do Sistema Único de Saúde (SUS) e a melhora do fluxo de atendimento e diagnóstico

1.9 Relevância

Na Amazônia o *Trypanosoma cruzi*, é mantido em um ciclo silvestre, sendo o consumo de alimentos contaminados, a principal forma de transmissão, uma vez que não há colonização de vetores no ambiente domiciliar ou no peridomicílio. A ausência

de manifestação de sintomas na maioria dos expostos, fazem com que a doença passe despercebida e uma pessoa seja portadora da doença crônica indeterminada.

Para o diagnóstico da DCC, precisa-se de resultados reativos em pelo menos dois testes sorológicos. Entretanto, os kits sorológicos utilizados, apresentam problemas na sensibilidade e especificidade, e nem sempre estão disponíveis no mercado. Em inquéritos sorológicos realizados na nossa região e em situações de casos suspeitos atendidos no ambulatório de DC da FMT-HVD, tem-se observado muitos resultados inconclusivos, dificultando o diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Aliado a isso, está o fato de que os kits sorológicos não utilizam linhagens do *T. cruzi* que circulam na nossa região (*T. cruzi* do ciclo silvestre), e isso pode ser um dos fatores para os resultados de casos inconclusivos relatados, ou ainda de falsos negativos. Com base nessa problemática, há necessidade de se buscar alternativas para o diagnóstico imunológico da DC, na nossa região.

O crescimento axênico de epimastigotas tem sido uma técnica utilizada na produção de antígenos de *T. cruzi* inteiros ou purificados por sua simplicidade de obtenção e alto rendimento de antígenos. Assim, acredita-se ser de relevância a utilização de antígenos de excreção e secreção com vistas a detecção de novos alvos para o diagnóstico sorológico da DC.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Investigar a atividade antigênica das excreções e secreções de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* DTU TcI e TcIV para doença de Chagas utilizando ELISA *in house*.

2.2 Específicos:

Demonstrar atividade de antigênica das excreções e secreções de epimastigota das linhagens TcI e TcIV em soros positivos e negativos para doença de Chagas;

Estimar a sensibilidade e especificidade dos antígenos secretados/excretados de epimastigota na detecção de IgG em soros positivos e negativos para doença de Chagas.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

Os resultados do estudo serão apresentados no formato de artigo **sob título**:

Avaliação da atividade de antígenos de excreção e secreção de epimastigotas de *Trypanosoma* TcI e TcIV em amostras sorológicas positivas e negativas para doença de Chagas, usando Ensaio Imunoenzimático *in house*

Emily de Sousa Moura¹, Susan Smith-Doria¹, Adriano Gomes da Silva³, Debora Raysa Texeira de Souza¹, Gabriela Maciel Alencar¹, Elsa Isela Guevara Moctezuma¹, Matheus Martins Monteiro¹, Denison Vital de Jesus*, Jorge Augusto de Oliveira Guerra², Maria das Graças Vale Barbosa Guerra^{1,2,4}

1. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas (UEA); 2. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) 3. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); 4. Fundação Hospitalar Alfredo da Matta. **in memoriam*

RESUMO

O diagnóstico laboratorial da doença de Chagas crônica (DCC) é realizado através de exames sorológicos e o resultado deve ser reativo em pelo menos 2 testes com princípios diferentes. De maneira geral os resultados apresentam divergências, particularmente em populações da Amazônia. Entre os fatores que podem estar associados estão kits sorológicos produzidos com linhagens de *Trypanosoma cruzi* de áreas endêmicas, que não circulam na Amazônia. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade dos antígenos de excreção e secreção de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* da região Amazônica, usando ELISA *in house*. O estudo foi realizado no laboratório de Doença de Chagas da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado. Os antígenos foram produzidos a partir de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, linhagens TcI e TcIV, isolados de pacientes com doença de Chagas aguda (DCA). Foram testados soros de pacientes autóctones da Amazônia com diagnóstico positivo para DCC, bem como soros de pessoas não reativas procedentes de área endêmica e não endêmica e com histórico de

leishmaniose, pelo método de ELISA-*in house*. Foram testadas 113 amostras de soros 32 (28,3%) soros do G1; 64(56%) do G2; 7(6,1%) do G3 e 10 (8,8%) do G4. Com exceção das amostras de soro do G3 todas apresentaram reatividade sendo no G1 22(68,7%) amostras testadas com antígeno de TcI, e 16(50%) de TcIV; no G2 16 (25%) com antígenos de TcI e 15(23,4%) de TcIV e no G4 7/ (70%) foram reativas em ambas as linhagens. Nas médias foi observado que existe diferença significativa entre os resultados de reatividade dos soros de pacientes positivos e negativos para DC e em soros de pacientes com histórico de leishmaniose. A reatividade das duas linhagens nas amostras avaliadas, responde de forma positiva aos objetivos propostos, mas evidencia a necessidade de novos estudo, que resultem apresentem maior sensibilidade e especificidade e possam ser recomendados para uso frequente na testagem de soros de pessoas expostas ao ciclo de transmissão

INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado do grupo Stercoraria, ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae (1,2), agente etiológico da doença de Chagas (DC), uma doença da América Latina que se dispersou para outros continentes (3,4). Estima-se que atualmente, 6-8 milhões de pessoas estejam infectadas, e destas 1,6 milhões estejam no Brasil (5). Diversas rotas, podem permitir a transmissão do *T. cruzi* ao homem, sendo a vetorial através do contato com as fezes de barbeiros, a mais comum, em ambientes onde ocorre a domiciliação do vetor e outras vias como, transfusional, transplante de órgãos congênita e a oral forma essa responsável por cerca de 70% dos casos agudos diagnosticados atualmente no Brasil (6–8).

Clinicamente a doença ocorre em duas fases, uma aguda (DCA), e outra crônica (DCC), podendo ser assintomática em ambas. Na DCC 70% dos casos (9,10) são assintomáticos definidos como indeterminados e nos 30% restantes podem ser identificadas as cardiopatias ou manifestações digestivas (11–13). Nas duas fases o diagnóstico laboratorial é muito importante para auxiliar as condutas a serem realizadas no seguimento clínico. Na DCA devido à alta parasitemia, o exame inicial recomendado é o parasitológico complementando-se com exames sorológicos

através da detecção de imunoglobulinas IgM (9,14). Na DCC há baixa parasitemia, sendo recomendados testes sorológicos, detectando-se IgG, sendo necessário reatividade em pelo menos 2 testes sorológicos, que podem ser o Ensaio imunoenzimático – ELISA, hemaglutinação indireta – HAI, imunofluorescência indireta – IFI ou Western blot (12,15–17).

Por ter um ciclo de vida complexo realizado em diferentes hospedeiros, mamíferos e insetos triatomíneos (18,19), o *T. cruzi* passa por adaptações e variações intraespecíficas. Ao longo dos anos, várias classificações foram sendo propostas tanto em nível morfológico, bioquímico e genético (20–22). A classificação atual é baseada em genótipos denominados de Unidades Discretas de Tipagem-DTU, (Discrete Typing Units) TcI-TcVI (23–27). Este parasito possui em sua estrutura antígenos de excreção e secreção, provavelmente envolvidos na sua disseminação e na resistência às defesas imunológicas do hospedeiro (28). Durante o curso da infecção, as diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* excretam e secretam, uma variedade de moléculas de membrana no meio em que vivem, através de um mecanismo conhecido como “shedding”, funcionando como escape do parasito ao sistema imune do hospedeiro. Muitas dessas proteínas apresentam grande atividade antigênica (29–31). O crescimento axênico de epimastigotas tem sido uma técnica utilizada na produção de antígenos de *T. cruzi* inteiros ou purificados por sua simplicidade de obtenção e alto rendimento de antígenos (32).

Na Amazônia o *Trypanosoma cruzi*, é mantido em um ciclo silvestre, e não há colonização de vetores no ambiente domiciliar ou no peridomicílio sendo o consumo de alimento contaminados, a principal forma de transmissão (1,8,27). Na ausência de sintomas na fase aguda, a doença passa despercebida e o portador pode evoluir para a DC crônica (8,33,34).

No Amazonas a doença vem sendo registrada em progressão crescente, tanto na sua forma aguda, quanto na forma crônica, e tem-se detectado as linhagens TcI de *T. cruzi* tanto em casos da DC aguda quanto crônica e na fase aguda as linhagens TcI, TcIII e TcIV (33,35–37). Em inquéritos sorológicos realizados nessa região e em situações de casos suspeitos atendidos no ambulatório de DC da FMT-HVD (Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado), tem-se observado muitos resultados

inconclusivos ou falsos negativos, dificultando o diagnóstico sorológico na DCC (34). Isso se deve ao fato de que os kits comerciais disponíveis no mercado utilizados nos testes sorológicos, utilizam extratos totais da linhagem TcII, TcV e TcVI para desenvolver os testes, linhagens que até o momento não tem sido descrita no Amazonas (38,39). Com base nessa problemática, considera-se relevante a busca de alternativas para o diagnóstico imunológico da DC particularmente na fase crônica nossa região. O objetivo deste estudo é avaliar a atividade de antígenos de excreção e secreção de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV em amostras de soro positivas e negativas para doença de Chagas, utilizando a técnica ELISA *in house*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo e procedimentos– Estudo realizado no laboratório de Doença de Chagas na Unidade de Entomologia Nelson Ferreira Fé da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado-FMT-HVD, no estado do Amazonas, Brasil, e faz parte de um projeto maior financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, Edital Universal 2018.

A produção dos antígenos de excreção e secreção até a testagem antigênica e análise estatística, foi realizada conforme fluxograma (Figura 1).

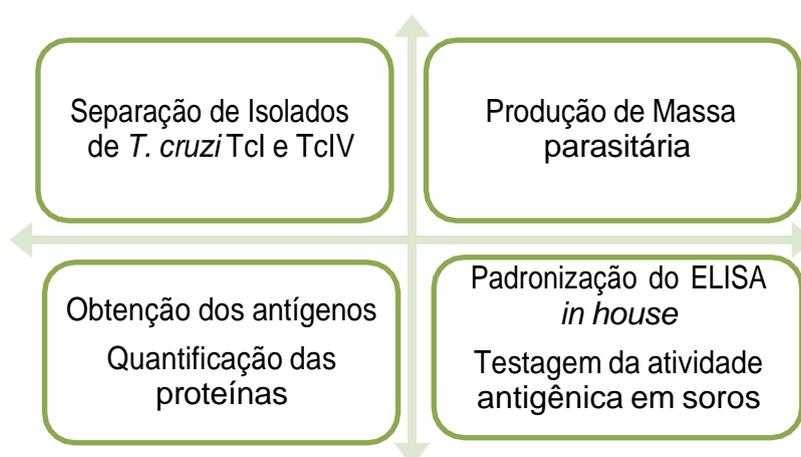


Figura 1. Fluxo de procedimentos para obtenção dos antígenos e testagem da atividade antigênica

Separação dos isolados - Inicialmente foi realizada a separação de isolados de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV de amostras de pacientes com DCA, autóctones do estado do Amazonas, sendo TcI de um paciente Manaus, no ano 2017 e TcIV de um paciente de surto ocorrido em Lábrea no ano de 2018, conservadas em nitrogênio, no laboratório da unidade de entomologia médica Nelson Ferreira Fé da FMTHVD.

Massa parasitária - Para obtenção de antígenos, produziu-se a massa parasitária utilizando as formas evolutivas epimastigotas de *T. cruzi*, linhagem TcI e TcIV. Os isolados foram descongelados e semeados em meio NNN (forma axênica), repicados posteriormente em meio Schneider, suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), seguindo os procedimentos padronizados no laboratório. Em cerca de dois dias, a massa parasitária obtida, foi submetida ao processo de centrifugação de 4000 g por 10 minutos à 4°C, descartando-se o sobrenadante.

Obtenção dos antígenos de excreção e secreção - O precipitado da massa parasitária foi submetido a 4 ciclos de lavagens com meio Schneider para eliminação de possíveis resíduos de SFB. Após as lavagens, a massa parasitária foi ressuspensa em 10mL do meio Schneider e transferida para o meio de cultura seguindo o protocolo de Berrizbeitia et. al. Os isolados foram colocados na estufa nas seguintes condições: isolado TcI foi colocado por 3 dias a 26° na BOD e o isolado TcIV foi colocado por 1 dia a 26° na BOD. Após esse tempo, a cultura crescida foi colocada em tubo falcon de 50mL e centrifugado a 2.800g a 4°C por 20 minutos. Ao final, o sobrenadante contendo os antígenos de excreção e secreção foi colhido e filtrado através de uma membrana millipore (0,44um) e armazenado em freezer -80°C para posterior quantificação das proteínas

Quantificação das Proteínas - Método Bradford - Para a quantificação das proteínas colocou-se 100uL do sobrenadante contendo os antígenos de excreção e secreção em microtubos, acrescentando-se 1000uL do reagente "Bradford reagente" (Sigma). Após 5 minutos o microtubo foi colocado numa cuba no espectrofotômetro Biomate3 em um comprimento de onda de 595nm e foi realizada a leitura conforme protocolo do fabricante. Foram obtidas as concentrações de [326ug/mL] em TcI e [216ug/mL] para TcIV.

Padronização das concentrações para realização do ELISA-in house - Inicialmente testou-se diferentes diluições do soro (1:50; 1:100), conjugado (1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000) e concentração dos antígenos de excreção e secreção (40, 20, 10,5,2.5,0 ug/mL). Nas amostras de soros para padronização, foi realizado um pool de 3 amostras de portadores da doença de Chagas e outro de pessoas negativas para doença de Chagas. A concentração escolhida do antígeno TcI foi 20ug/mL e TcIV, 10ug/mL. Na concentração do soro foi 1:50 e conjugado 1:500 de acordo com a padronização (Quadro 1).

Quadro 1. Modelo da placa com a padronização das concentrações

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	CONJ 500
B	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	CONJ 1000
C	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	CONJ 2000
D	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	CONJ 4000
E	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	CONJ 500
F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	CONJ 1000
G	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	CONJ 2000
H	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	CONJ 4000
	SORO 1:50						SORO 1:100						
	AG 40	AG 20	AG 10	AG 5	AG 2.5	AG 0	AG 40	AG 20	AG 10	AG 5	AG 2.5	AG 0	

Grupos de soros para testagem da atividade antigênica - Os antígenos obtidos foram testados em soros de quatro grupos de pessoas:

Grupo 1: pessoas com sorologia positiva para DC autóctones do Amazonas divididas em três subgrupos:

Subgrupo a) inquérito sorológico de pacientes pós-agudo,

Subgrupo b) inquérito sorológico para DCC

Subgrupo c) inquérito sorológico de expostos em surtos com diagnóstico negativo para DCA;

Grupo 2: pessoas de área endêmica com sorologia negativa para DC;

Grupo 3: pessoas de área não endêmica com sorologia negativa para DC;

Grupo 4: pessoas com sorologia negativa para DC com histórico de leishmaniose.

Procedimentos para utilização do ELISA-*in house* - foram sensibilizadas placas de poliestireno (Thermo Fisher Scientific) com 96 poços numa concentração de 20µg/ml (Tcl) e 10µg/ml (TclV), e incubado overnight a 4°C. Posteriormente à incubação, as placas foram lavadas 3 vezes em solução de PBS/0.05% Tween 20, bloqueadas por 2 horas com SFB 10% em PBS, lavadas novamente e incubadas overnight com os soros na diluição 1:50. No dia seguinte, as placas foram lavadas 6 vezes e incubadas por 1 hora com conjugado anti-IgG humano (INVITROGEN®) na diluição de 1:500. Posteriormente foram lavadas e adicionado o OPD (O-Fenilenodiamina) incubando-se as placas por 10 minutos ao abrigo da luz. Passados os 10 minutos, foi adicionado HCl 2N para interromper a reação e realizada a leitura em leitora de microplaca (ThermoPlate) com filtro de 492nm.

Análise estatística - Para determinar ocorrência de diferenças significativas entre as médias dos resultados de densidade ótica dos diferentes grupos de amostras de soros, realizou-se Análise de Variância “ANOVA” e o teste Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($P < 0.05$), utilizando-se o programa PRISM 6. Na análise de concordância entre os testes foi realizada utilizando-se o índice KAPPA através do software Graphpad (entre 0,21 e 0,4 – concordância razoável; 0,41 e 0,6 – concordância moderada; 0,61 e 0,8 – concordância substancial; 0,81 e 1 concordância quase perfeita).

Para determinar a sensibilidade e especificidade dos antígenos foram realizadas duas curvas ROC (Receiver Operating Characteristic), uma testando os soros negativos para DC com os positivos e outra incluindo os soros de pacientes com histórico de leishmaniose utilizando o programa de PRISM 6.

Sensibilidade é a capacidade do teste detectar corretamente resultados positivos e especificidade, é a capacidade do teste detectar corretamente resultados negativos. A curva ROC ilustra como varia a sensibilidade e a especificidade do teste, conforme se consideram diferentes valores de corte. Ela ajuda a definir o valor de corte ideal, para as finalidades do exame. No eixo X (horizontal), observa-se a taxa de falsos positivos (o oposto da especificidade: $1 - \text{especificidade}$); no eixo Y (vertical), a taxa

de verdadeiros positivos (a sensibilidade). Quanto maiores os valores de sensibilidade e de especificidade (mais próximos de 100%), maior a acurácia do teste.

Aspectos éticos - Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas no Programa Universal, aprovado pelo CEP da FMT-HVD, sob CAAE: 97505318.7.0000.0005.

RESULTADOS

Testagem da atividade antigênica em soros nos diferentes grupos - Foram testadas 113 amostras de soros, sendo 32 (28,3%) amostras com sorologia positiva para DC (G1); 64(56%) amostras de pessoas de área endêmica com sorologia negativa para DC (G2); 7(6,1%) amostras de pessoas de área não endêmica com sorologia negativa para DC (G3) e 10 (8,7%) amostras de soros de pessoas com sorologia negativa para DC com histórico de leishmaniose (G4). Foram observados os seguintes resultados: a) Soros do G1 - 22(68,7%) foram reativos ao antígeno da linhagem TcI, e 16(50%) ao TcIV; b) Soros do G2 - 16 (25%) foram reativos ao antígeno de TcI e 15(23,4%) ao TcIV; c) Soros do G3 - Não se observou reatividade; d) soros do G4 - 7/(70%) foram reativos à ambas linhagens (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos resultados da atividade antigênica de *T. cruzi* DTUs TcI e TcIV em amostras de soro por grupo avaliado

SOROS	/	TcI (%)	TcIV (%)	TcI e TcIV (%)
GRUPOS (N)				
Grupo 1 (32)		22/32 (68,7)	16/32 (50)	14/32 (43,7)
Grupo 2 (64)		16/64 (25)	15/64 (23,4)	16/64 (25)
Grupo 3 (7)		0/7 (0)	0/7 (0)	0/7(0)
Grupo 4 (10)		7/10(70)	7/10 (70)	7/10 (70)
Total reativos		46/113 (40,7)	38/113 (33,6)	37/113 (32,7)

Nas análises das amostras do Grupo 1 (reativas para DC) se observou que os antígenos apresentaram boa reatividade, com maior percentual para a linhagem TcI (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição dos resultados da reatividade do soro com antígenos de *T. cruzi* DTUs TcI e TcIV em amostras de soro do grupo 1

SUBGRUPO "A" - PÓS AGUDO	N = 27	TcI 18/27 (66,6%)	TcIV 13/27 (48,1%)
Barcelos (isolado - 2022)	1	1/1(100%)	1/1(100%)
Coari (Surto - 2007)	8	7/8 (87,5%)	4/8 (62,5%)
Carauari (Surto 2011 e 2015=7 isolado=4)	11	6/11 (54,5%)	5/11 (45,4%)
Uarini (Surto 2019)	2	2/2 (100%)	2/2 (100%)
Lábrea (Surto 2018)	5	2/5 (40%)	1/5 (20%)
SUBGRUPO B - INQUÉRITO SOROLÓGICO	N=3	3/3 (100%)	2/3 (75%)
Barcelos (Inquérito – 2022)	2	2/2 (100%)	1/2 50%)
Tefé (Inquérito 2007)	1	1/1(100%)	1/1(100%)
SUBGRUPO C - EXPOSTOS EM SURTO (consumo de açaí)	N=2	1/2 (50%)	1/2 (50%)
Uarini (Exposto surto 2023)	2	1/2 (50%)	1/2 (50%)
Total Subgrupo 1	32	22/32 (68,7%)	16/32 (50%)

ELISA *in house* - Todos os dados obtidos das densidades óticas apresentaram distribuição normal. Foi observado que existe diferença significativa entre as médias das densidades óticas do grupo POS comparado com as do grupo NEG [$P < 0.0001$] ou do grupo NEG+LEISH nos soros testados com antígenos de TcI [$P < 0.001$], no entanto, não houve diferença significativa entre as médias dos grupos de soros NEG comparado com as do grupo NEG+LEISH [$P = 0.89004$] (Figura 1), observa-se também para linhagem TcIV entre as médias das densidades óticas entre os grupos positivos comparado com o grupo NEG [$P = 0.0048$] ou NEG+LEISH [$P = 0.0102$]. Durante a comparação com o grupo NEG e NEG+LEISH não demonstrou diferença significativa [$P = 0.8977$] (Figura 2).

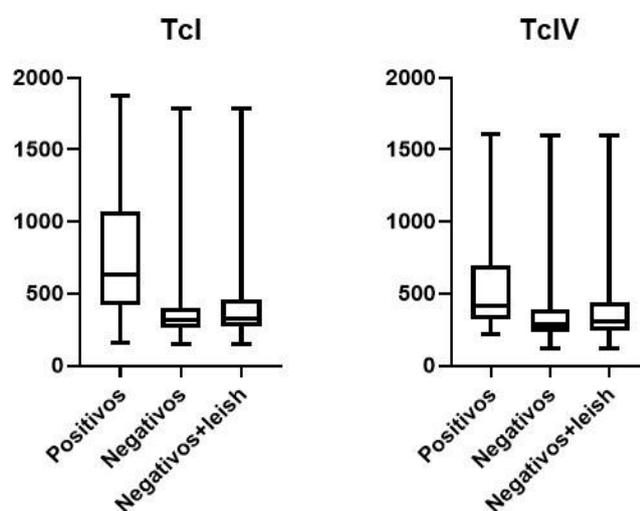


Figura 2. Médias das densidades óticas, das análises dos grupos de soros positivos para DC (POS: POSITIVOS), do soro negativo para DC (NEG: NEGATIVOS) e o grupo de soros negativos para DC junto com os soros de pacientes com Leishmaniose (NEG+LEISH), testados com antígenos de *T. cruzi* TcI e TcIV

Curva ROC - Se observou que quando testados em soros positivos para DC a sensibilidade dos antígenos das duas linhagens foi similar, sendo a de TcIV levemente maior (77.46%) (Figura 3 B1), enquanto que a especificidade foi maior (85.7%) para o antígeno da linhagem TcI (Figura 3A1). Entretanto se observou reatividade em relação aos soros de pessoas de áreas endêmicas negativos para DC e positivos para Leishmaniose o que caracteriza reação cruzada (Figura 3).

Índice Kappa - De acordo com o índice kappa, os resultados demonstraram uma concordância de 0.700 (intervalo de confiança de 95%, IC= 0,56 – 0,83).

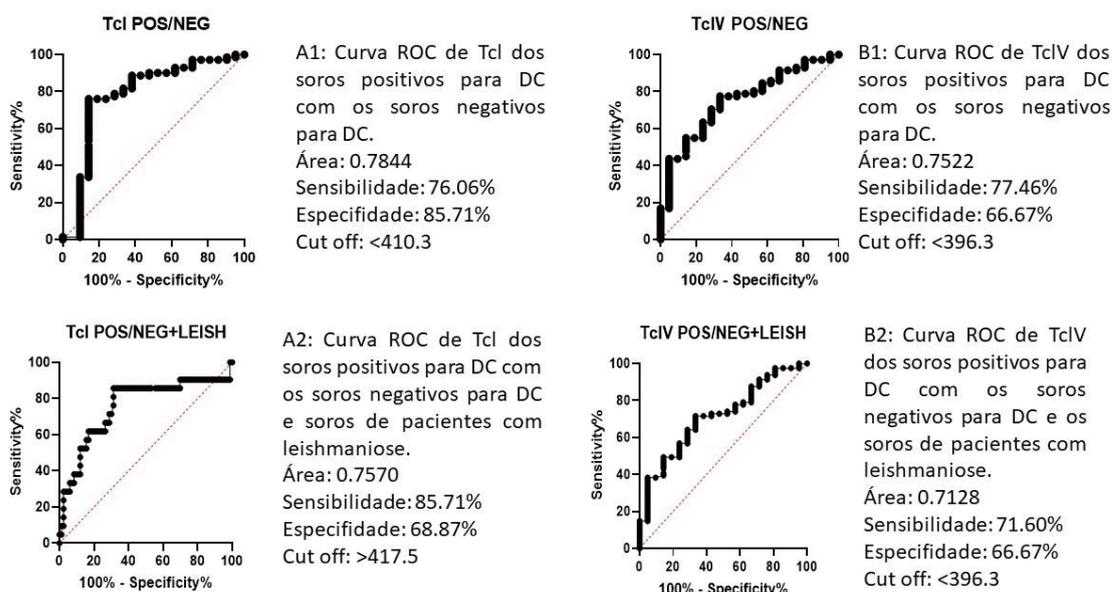


Figura 3. Imagem da curva ROC gerada nos diferentes grupos de soros e antígenos avaliados. A. Antígenos de TcI B. Antígenos de TcIV.

DISCUSSÃO

Na Amazônia, a transmissão da DC ocorre de forma diferente de áreas endêmicas, por não haver triatomíneos colonizando os domicílios, sendo considerada a área que concentra o maior número de casos da DC aguda, predominando a transmissão oral (40,41). Devido a alta parasitemia nessa fase da doença, este cenário vem sendo observado desde meados da década de 2000, pela vigilância da malária (14). Os casos crônicos são detectados de forma eventual, em doadores de sangue, serviço de atendimento em cardiologia ou em inquéritos sorológicos, diagnosticados em amostras de soros, pela detecção anticorpos anti *T. cruzi* da classe IgG, sendo obrigatório reatividade em pelo menos dois testes com princípios diferentes (7). O problema é que a detecção de IgG em portadores da DC tem sido um desafio, porque frequentemente se observa resultados divergentes, ou inconclusivos ou ainda falsos positivos estimulando o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico sorológico mais específicas, entre elas a utilização de antígenos purificados específicos para *T. cruzi*, ou de anticorpos monoclonais que permitem a eliminação das reações cruzadas com outros tripanosomatídeos (42–44).

Entre os fatores apontados como possíveis determinantes das divergências nos resultados de teste sorológicos, está a produção de kits sorológicos com antígenos de linhagens do *T. cruzi* de áreas endêmicas específicas (39,45,46), sugerindo que a testagem de soros seja realizada com antígenos específicos.

Extratos totais do parasita e antígenos recombinantes, tem sido utilizados, e antígenos de excreção e secreção de epimastigotas de *T. cruzi* tem sido apontados como opções por serem de simples obtenção, (32,47), e isso motivou o desenvolvimento desse trabalho. No entanto, foram observadas dificuldades para a padronização da cultura, uma vez que as duas linhagens de *T. cruzi* apresentaram características distintas de crescimento, vivenciando-se um processo bastante laborioso. Antígenos de excreção e secreção de epimastigotas resultam em muitas variações na sensibilidade e especificidade. A otimização durante a obtenção desses antígenos, pode aumentar a sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico (39,59). No entanto, resultados contraditórios têm sido encontrados por diferentes métodos, provavelmente devido ao uso de diferentes frações de antígenos de diferentes cepas de *T. cruzi* que resultam em variações na sensibilidade e especificidade dando reações falso-positivas (23,55,58).

Nesse estudo os processos metodológicos realizados permitiram demonstrar a atividade antigênica de TcI e TcIV em amostras de soro de pessoas dessa região, mas quando é observado sobre amostras de soro negativas para DC, e com histórico de leishmaniose no passado, reitera o problema de reatividade cruzada. Numa região endêmica para outras parasitoses entre elas a leishmaniose, mesmo tendo-se observado maior taxa de atividade com a linhagem TcI do que com os antígenos de TcIV, há necessidade de novos ensaios para corroborar ou refutar a hipótese de que o uso das linhagens de *T. cruzi* circulante nessa região, poderiam ter um desempenho diferente. No subgrupo b do G1 foram testadas amostras de soro de pessoas expostas, sem manifestação de sintomas e conseqüentemente não foram diagnosticadas e nem foram tratadas para DC. A sensibilidade demonstrada com as amostras de soro nas duas linhagens aponta para a possibilidade de seu uso em novos testes que visam o aprimoramento do diagnóstico sorológico.

Destaca-se que em inquérito sorológico para DCC, realizado em Manaus foi identificada a linhagem TcI (26,33), enquanto que TcIV vem sendo encontrada em casos de DCA por transmissão oral (8,35,40). Nesse contexto, a atividade das duas linhagens em amostras de soros de pessoas naturais de área de transmissão vetorial, como Barcelos, ou expostas durante os surtos (consumo de açaí contaminado, mas sem evidência de infecção no momento do diagnóstico), pode ser entendida como uma boa resposta aos objetivos propostos, podendo-se dizer que os antígenos se apresentam como alternativas promissoras nessa busca de opções sobre atividade antigênica de *T. cruzi*.

A análise de concordância através do teste Kappa demonstrou uma concordância boa entre as linhagens (0,7) uma vez que a concordância entre 0,5 e 0,7 é considerada “boa”. Estudos que utilizaram diferentes antígenos demonstraram concordâncias variáveis, resultando em dificuldade na sorologia da DC (54,56,60). Em relação a média das densidades óticas nas duas linhagens, apresentaram valores significativos, tendo em vista que a média das densidades óticas serve para determinar a eficácia do teste para diferenciar entre os soros de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, assim como também para comparar testes (48–50). Na análise da curva ROC foi observado que a especificidade da atividade antigênica diminui nas duas linhagens quando ocorre a introdução dos soros de pacientes com leishmaniose, afetando assim a efetividade do teste, devido a reatividade cruzada. A região amazônica é endêmica para leishmaniose (51,52), e outras doenças, fato importante para as discordâncias nos testes sorológicos utilizados no diagnóstico da DC (32,53–56).

O registro da atividade dos antígenos de *T. cruzi*, circulante na Amazônia, em diferentes amostras de soro, estimulam a continuidade e aprimoramento dessa metodologia, e reiteram a importância de se investigar alvos como proteínas ou antígenos definidos, contendo epítomos específicos do *T. cruzi*, e melhorar a sensibilidade e especificidade. Considera-se, portanto, que os resultados aqui apresentados, oportunizam novos estudos, como alternativas para a busca do aprimoramento do diagnóstico sorológico da DCC.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Brener Z. *Typanosoma cruzi: morfologia e ciclo evolutivo*. Scielo Books. 1997;24–31.
2. Bacerril Flores MA. *Parasitologia Média*. 4a ed. Mc Graw Hill Education, organizador. 2014. 95–104 p.
3. Andrade JP de, Marin-Neto JA, Paola AAV de, Vilas-Boas F, Oliveira GMM, Bacal F, et al. [Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2011;97(2 Suppl 3):1–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21952638>
4. Basile L, Jansà JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, et al. Chagas disease in European countries: The challenge of a surveillance system. *Eurosurveillance*. 2011;16(37):3.
5. World Health Organization (WHO). *Integrating neglected tropical diseases*. World Health Organization. 2017. Fact Sheet March 2017.
6. Malta ALC, Jaques U, Rodrigues BS de SL. Atualizações sobre o diagnóstico, tratamento e epidemiologia da doença de Chagas via oral no Brasil / Updates on the diagnosis, treatment and epidemiology of oral Chagas disease in Brazil. *Brazilian J Dev*. 2022;8(4):26989–7009.
7. Dias JCP, Ramos AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. Aspectos Gerais da Epidemiologia da Doença de Chagas com Especial Atenção ao Brasil. *Epidemiol e Serv Saude Rev do Sist Unico Saude do Bras*. 2016;25:7–86.
8. Santana RAG, Guerra MGVB, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz J V, Oliveira M, et al. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(1):132–5.
9. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018;391(10115):82–94.
10. Suárez C, Nolder D, García-Mingo A, Moore DA, Chiodini PL. Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas. *Res Rep Trop Med*. 2022;Volume 13(June):25–40.
11. Coura JR, Borges-Pereira J. Doença de Chagas. O que é conhecido e o que deve ser melhorado: Uma visão sistêmica. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(3):286–96.
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. Matsuda NM, Miller SM, Evora PRB. The chronic gastrointestinal manifestations of chagas disease. *Clinics*. 2009;64(12):1219–24.
14. Junqueira AC V, Gonçalves TCM. Curso de capacitação dos microscopistas de malária e dos laboratoristas da rede pública na detecção do *Trypanosoma cruzi* (módulos I, II e III). 2014;
15. PAHO. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Washington, D.C. OPS; 2018 [Internet]. Vol. 12, Ops. 2018. 1–172 p. Available at: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/49653?locale-attribute=en%0Awww.paho.org>
16. Who. Integrating neglected tropical diseases into global health and development. Fourth WHO report on neglected tropical diseases. 2017.
17. Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett A. Microplate Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Chagas' Disease. *Lancet*. 1975;305(7904):426–8.
18. Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. Vol. 79, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1984. p. 513–5.
19. Roque ALR, Jansen AM. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. *Vetores da doença Chagas no Bras*. 2014;75–87.
20. Miles MA, Cibulskis RE. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 1986;2(4):94–7.
21. Fernandes AJ, Diotaiuti L, Dias JCP, Romanha ÁJ, Chiari E. Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Publica*. 1994;10(4):473–80.
22. Carneiro M, Chiari E, Gonçalves AM, da Silva Pereira AA, Morel CM, Romanha AJ. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop*. 1990;47(1):35–45.
23. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* [Internet]. 2018;184:38–52. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
24. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009;136(6):641–55.
25. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O,

- et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):1051–4.
26. 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. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1):1–7.
 27. Brito AKSB de, Sousa DRT de, Silva Junior EF da, Ruiz HJ da S, Arcanjo ARL, Ortiz JV, et al. Acute micro-outbreak of Chagas disease in the southeastern Amazon: a report of five cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2022;55(June):e0687.
 28. Marín C, Sánchez-moreno M. chapter 2 Excreted / Secreted Antigens in the Diagnosis of Chagas ' Disease. 2010;10–20.
 29. Colli W, Alves MJM. Relevant Glycoconjugates on the Surface of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):37–49.
 30. Acosta-Serrano A, Almeida IC, Freitas-Junior LH, Yoshida N, Schenkman S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: Structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;114(2):143–50.
 31. Briones MRS, Egima CM, Schenkman S. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase gene lacking C-terminal repeats and expressed in epimastigote forms. *Mol Biochem Parasitol*. 1995;70(1–2):9–17.
 32. Berrizbeitia M, Figueroa M, Ward BJ, Rodríguez J, Jorquera A, Figueroa MA, et al. Development and application of an ELISA assay using excretion/secretion proteins from epimastigote forms of *T. cruzi* (ESEA Antigens) for the diagnosis of chagas disease. *J Trop Med*. 2012;2012.
 33. Barbosa M das GV, Ferreira JM BB, 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 2013):27–33.
 34. Magalhães BML, Coelho LIARC, Maciel MG, Ferreira JM BB, 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.
 35. 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).
36. 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.
 37. 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.
 38. Vercauteren G. Anti-trypanosoma cruzi assays: operational characteristics. *World Heal Organ*. 2010;41.
 39. Truyens C, Dumonteil E, Alger J, Cafferata ML, Ciganda A, Gibbons L, et al. Geographic Variations in Test Reactivity for the Serological Diagnosis of Trypanosoma cruzi Infection. *J Clin Microbiol*. 2021;59(12).
 40. de Sousa DRT, de Oliveira Guerra JA, Ortiz JV, do Nascimento Couceiro K, da Silva e Silva MRH, Jorge Brandão AR, et al. Acute Chagas disease associated with ingestion of contaminated food in Brazilian western Amazon. *Trop Med Int Heal*. 2023;1–10.
 41. SINAN [Internet]. 2023. Available at: <https://portalsinan.saude.gov.br/>
 42. Magalhães BML, Coelho LIARC, Maciel MG, Ferreira JM BB, 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.
 43. 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.
 44. Ortiz JV, Couceiro KDN, Doria SS, de Sousa DRT, da Silveira HMC, Kesper Junior N, et al. Chagas cardiomyopathy in the Brazilian amazon region: Low prevalence or underdiagnosis? *Arq Bras Cardiol*. 2021;117(4):770–4.
 45. Sáez-Alquezar A. A origem geográfica de pessoas com a doença de Chagas crônica no Brasil impacta o desempenho de testes comerciais para IgG anti-T. *Cruzi*. CmslfccOrg [Internet]. :37–47. Available at: <https://cms.ifcc.org/wp-content/uploads/2023/02/37-Testes-IgG-anti-T.pdf>
 46. World Health Organization. Anti-Trypanosoma cruzi assays: Operational

- Chracteristics. 2010.
47. Escalante H, Jara C, Davelois K, Iglesias M, Benites A, Espinoza R. Artículo original western blot technique standardization for specific diagnosis of chagas disease using excretory-secretory. *Rev Peru med exp salud publica* [Internet]. 2014;31(4):6–8. Available at: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000400005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 48. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché A, Lacouture S, 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.
 49. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk 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(6):419–31.
 50. 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(3):169–76.
 51. De Guerra JAO, Maciel MG, De Guerra MVF, Talhari AC, Prestes SR, Fernandes MA, et al. Tegumentary leishmaniasis in the state of amazonas: What have we learned and what do we need? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(July 2014):12–9.
 52. Ferreira F da C, Ferreira NR. Epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis in the Amazon Region, Brazil, between 2010 and 2019. *Sci Med (Porto Alegre)*. 2022;32(1):1–7.
 53. 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.
 54. Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, De La Soledad Lagunes-Castro M, 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. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2015;8(1):1–8.

Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1072-2>

55. 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.
56. 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. *Enfermedades Emergentes*. 2009;11(1):22–9.
57. Tandaypán AV, Escalante H. Comparación de antígenos de excreción-secreción de epimastigotes (esea) y tripomastigotes (tesa) de *Trypanosoma cruzi* mediante Western blot para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev Cient Ciencias Biológicas la Univ Nac Trujillo*. 2015;35(2):53–61.
58. Santos FLN, De Souza WV, Da Silva Barros M, Nakazawa M, Krieger MA, De Miranda Gomes Y. Chronic Chagas disease diagnosis: A comparative performance of commercial enzyme immunoassay tests. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(5):1034–9.
59. Caballero E. Z, Correa R, Nascimento MS, Villarreal A, Llanes A, Kesper, N. High sensitivity and reproducibility of in-house ELISAs using different genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*. 2019;41(7):1–12.
60. Sánchez B, Monteón V, Reyes PA, 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(5):382–8.

4. CONCLUSÃO

Foi demonstrada a atividade antigênica de excreção e secreção de epimastigota das linhagens TcI e TcIV em soros positivos e para doença de Chagas;

A sensibilidade e especificidade das duas linhagens foi similar, sendo de TcIV levemente maior 77.46%, enquanto TcI demonstrou maior especificidade 85.7%;

A reatividade em soros negativos para DC e positivos para Leishmaniose, caracterizaram reação cruzada.

5. LIMITAÇÕES E RECOMENDAÇÕES

Este foi um estudo piloto e entre as limitações enfrentadas estão as restrições impostas pela pandemia da Covid-19 que dificultou a execução dos procedimentos laboratoriais.

6. REFERÊNCIAS

1. Malafaia G, de Lima Rodrigues AS. Centenário do descobrimento da doença de chagas: Desafios e perspectivas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(5):483–5
2. Who. Integrating neglected tropical diseases into global health and development. Fourth WHO report on neglected tropical diseases 2017.
3. 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
4. Basile L, Jansà JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, et al. Chagas disease in european countries: The challenge of a surveillance system. *Eurosurveillance*. 2011;16(37):3
5. Andrade JP de, Marin-Neto JA, Paola AAV de, Vilas-Boas F, Oliveira GMM, Bacal F, et al. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol [Internet]*. 2011;97(2 Suppl 3):1–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21952638>
6. Westphalen EVNA, Bisugo MC, Araújo M de FL. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. *Secr Estado da Saúde São Paulo [Internet]*. 2012;9(105):17–34. Available at: http://www.cve.saude.sp.gov.br/bepa/txt/bepa105_chagas.htm
7. Gállego Berenguer J. *Manual de Parasitología: Morfología y Biología de los parásitos de interés sanitario*. Barcelona EU, organizador. 2006. 148–164 p.
8. Brener Z. *Typanosoma cruzi: morfologia e ciclo evolutivo*. Scielo Books. 1997;24–31
9. Herrera L. *Revisões*. 2015;(July 2010)
10. Magalhães LKC, Barbosa MG V, Ciriano CM, Fabiano MP, Fé NF, Fé FAA, et al. Vetores e reservatórios da doença de Chagas no Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41:227–8
11. Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum Didelphis marsupialis*. Vol. 79, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1984. p. 513–5
12. Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas' Disease. Vol. 114, *International Archives of Allergy and Immunology*. 1997. p. 103–10

13. 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
14. Galvão C, Paula AS de. Sistemática e evolução dos vetores. *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. 2014. 26–32 p.
15. 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.
16. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. 1973;27:347–82.
17. Bacerril Flores MA. *Parasitologia Médica*. 4a ed. Mc Graw Hill Education, organizador. 2014. 95–104 p.
18. Guhl F. Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Esp Salud Publica*. 2013;2013(1):1–8.
19. Carneiro M, Chiari E, Gonçalves AM, da Silva Pereira AA, Morel CM, Romanha AJ. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop*. 1990;47(1):35–45.
20. Miles MA, Cibulskis RE. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 1986;2(4):94–7.
21. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):1051–4.
22. 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* [Internet]. 2012;12(2):240–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
23. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* [Internet]. 2018; 184:38–52. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
24. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by

- phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009;136(6):641–55.
25. 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(7):477–9.
 26. Velásquez-ortiz N, Herrera G, Hernández C, Muñoz M, Ramírez JD. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* : Geographical and biological distribution in the Americas. 2022;1–8.
 27. Schmunis GA, Zicker F, Pinheiro F, Brandling-Bennett D. Risk for transfusion-transmitted infectious diseases in Central and South America. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(1):5–11.
 28. Takle, G. B.; Snary D. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. 3º ed. Scientific B, Publications, organizadores. Boston; 1992. 213–236 p.
 29. Machado MO. Análise do secretoma/excretoma da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. 2013;1–109.
 30. Colli W, Alves MJM. Relevant Glycoconjugates on the Surface of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):37–49.
 31. Frasch ACC. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 2000;16(7):282–6.
 32. Cámara M de los M, Cánepa GE, Lantos AB, Balouz V, Yu H, Chen X, et al. The Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) regulates *Trypanosoma cruzi* infectivity and differentiation. *plos negl Trop Dis*. 2017;11(8):1–21.
 33. Malta ALC, Jaques U, Rodrigues BS de SL. Atualizações sobre o diagnóstico, tratamento e epidemiologia da doença de chagas via oral no Brasil / Updates on the diagnosis, treatment and epidemiology of oral chagas disease in Brazil. *Brazilian J Dev*. 2022;8(4):26989–7009.
 34. Dias JCP, Ramos AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. Aspectos Gerais da Epidemiologia da Doença de Chagas com Especial Atenção ao Brasil. *Epidemiol e Serv saude Rev do Sist Unico Saude do Bras*. 2016;25:7–86.
 35. Santana RAG, Guerra MGVB, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz J V, Oliveira M, et al. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(1):132–5.
 36. Brito AKSB de, Sousa DRT de, Silva Junior EF da, Ruiz HJ da S, Arcanjo ARL,

- Ortiz JV, et al. Acute micro-outbreak of Chagas disease in the southeastern Amazon: a report of five cases. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2022;55(June):e0687.
37. de Sousa DRT, de Oliveira Guerra JA, Ortiz JV, do Nascimento Couceiro K, da Silva e Silva MRH, Jorge Brandão AR, et al. Acute Chagas disease associated with ingestion of contaminated food in Brazilian western Amazon. *Trop Med Int Heal.* 2023;1–10.
 38. Dias JCP. Acute Chagas' disease. Vol. 79, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1984. p. 85–91.
 39. Coura JR, Borges-Pereira J. Doença de Chagas. O que é conhecido e o que deve ser melhorado: Uma visão sistêmica. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(3):286–96.
 40. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet.* 2018;391(10115):82–94.
 41. Suárez C, Nolder D, García-Mingo A, Moore DA, Chiodini PL. Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas. *Res Rep Trop Med.* 2022;Volume 13(June):25–40.
 42. Ortiz JV, Pereira BVM, Couceiro KDN, E Silva MRH da S, Doria SS, da Silva PRL, et al. Cardiac evaluation in the acute phase of chagas' disease with post-treatment evolution in patients attended in the state of Amazonas, Brazil. *Arq Bras Cardiol.* 2019;112(3):240–6.
 43. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of chagas disease. *Lancet infection disease. Clin Epidemiol Asp Chagas Dis.* 2001;1(September):92–100.
 44. 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.
 45. Ribeiro AL, Rocha MO. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31(3):301–14.
 46. Matsuda NM, Miller SM, Evora PRB. The chronic gastrointestinal manifestations of chagas disease. *Clinics.* 2009;64(12):1219–24.
 47. Ortiz JV, Couceiro KDN, Doria SS, de Sousa DRT, da Silveira HMC, Kesper Junior N, et al. Chagas cardiomyopathy in the Brazilian amazon region: Low prevalence or underdiagnosis? *Arq Bras Cardiol.* 2021;117(4):770–4.
 48. Fuchs A. P., Fioratti V. L., Mello V. A. BE. Diagnóstico sorológico na doença de Chagas. Estudo comparativo de diferentes técnicas. *Rev Inst Med trop São Paulo.* 1980;242–5.

49. Luquetti A, Rassi A. Diagnóstico Laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. 2000. 344–378 p.
50. Marín C, Sánchez-moreno M. chapter 2 Excreted / Secreted Antigens in the Diagnosis of Chagas' Disease. 2010;10–20.
51. Junqueira AC V, Gonçalves TCM. Curso de capacitação dos microscopistas de malária e dos laboratoristas da rede pública na detecção do *Trypanosoma cruzi* (módulos I, II e III). 2014;
52. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med trop São Paulo*. 1966;227–35.
53. WHO. Control of Chagas disease. World Health Organization - Technical Report Series. 2002.
54. PAHO. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Washington, D.C. OPS; 2018 [Internet]. Vol. 12, Ops. 2018. 1–172 p. Available at: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/49653?localeattribute=en%0Awww.paho.org>
55. Vercauteren G. Anti-trypanosoma cruzi assays: operational characteristics. *World Heal Organ*. 2010;41.
56. Urbina JA. Etiologic Treatment of Chagas Disease: Old Drugs, New Insights, Challenges, and Perspectives. *Chagas Disease*. 2020. 123–144 p.
57. Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett A. Microplate Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Chagas' Disease. *Lancet*. 1975;305(7904):426–8.
58. Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol*. 1999;37(5):1554–60.
59. Camargo ME, Segura EL, Kagaq IG, Mark J, Souza P, Carvazheiro R, et al. Three Years of Disease Serodiagnosis in the. *Bull Pan Am Heal Organ (PAHO)*;20(3),1986" [Internet]. 1986; Available at:<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/27228>
60. Gadelha AÂM, Verçosa AFA, Lorena VMB, Nakazawa M, Carvalho AB, Souza W V., et al. Chagas' disease diagnosis: Comparative analysis of recombinant Elisa with conventional Elisa and the hamagglutination test. *Vox Sang*. 2003;85(3):165–70.

61. Gomes YM, Lorena VMB, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: What has been achieved? what remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(SUPPL. 1):115–21.
62. Durans A da M. Obtenção de uma nova proteína quimérica para o uso em teste de diagnóstico sorológico da infecção pelo trypanosoma cruzi. 2018.
63. Escalante H, Jara C, Davelois K, Iglesias M, Benites A, Espinoza R. Artículo Original Western blot technique standardization for specific diagnosis of chagas disease using excretory-secretory. *Rev Peru med exp salud publica* [Internet]. 2014;31(4):6–8. Available at: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000400005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
64. Carlos Chagas. Infection naturelle des singes du Para (*Chrysothrix sciureus* L), par *Trypanosoma cruzi*. In: Sociedade Brasileira de Biologia. São Paulo; 1924.
65. Belém EM, Shaw J, Lainson R. Considerações Sobre a Epidemiologia Dos Primeiros Casos Autóctones De Doença De Chagas Registrados. 1969;(1):1–5.
66. Coura JR, Junqueira ACV, Bóia MN, Fernandes O, Bonfante C, Campos JE, et al. Chagas disease in the Brazilian Amazon. IV. A new cross-sectional study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002;44(3):159–65.
67. 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.
68. Kardec A, Galardo R, Cristina K, Cardoso I. Estudo epidemiológico do comportamento da doença de Chagas no estado do Amapá-Brazil nos anos de 2016 a 2021 Epidemiologic study about Chagas disease in Amapá State Brazil in the years 2016 at 2021 Estudio epidemiológico del comportamiento de la enfermeda. 2022;2022(Cd):2016–23.
69. de Oliveira GF, Ribeiro MAL, Castro GV de S, Menezes ALR, Lima RA, Silva RPM, et al. Retrospective study of the epidemiological overview of the transmission of Chagas disease in the State of Acre, South-Western Amazonia, from 2009 to 2016. *J Hum Growth Dev*. 2018;28(3):329–36.
70. Madeira FP, de Jesus AC, da Silva Moraes MH, Barroso NF, de Souza Castro GV, Ribeiro MAL, et al. Chagas Disease in the Western Brazilian Amazon:

- Epidemiological Overview from 2007 to 2018. *J Hum Growth Dev.* 2021;31(1):84–92.
71. Carvalho EOC de, Rosa JA da, Carvalho AA de, Chaves HCO, Souza EA de, Ostermayer AL, et al. Study on Chagas disease occurrence in the municipality of Monte Negro, State of Rondônia, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(6):703–7.
 72. Brasil. Boletim Epidemiológico Doença de Chagas - 14 de abril - dia Mundial. Secr Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde [Internet]. 2020;(Especial):42. Available at: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/Abril/23/boletim-especial-chagas-20abr20.pdf>
 73. Ferraroni JJ, Melo JAN de, Camargo ME. Ocorrência de seis casos suspeitos, autóctones sorologicamente positivos (). *Acta Amaz.* 1977;7(3):438–40.
 74. França MS, Frade JM, Konasugawa K, Almeida FB de. Doença de Chagas - primeiro caso autóctone na Amazônia Ocidental - Amazonas - Brasil. *Acta Amaz.* 1980;10(4):759–62.
 75. 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).
 76. de Souza-Lima R de C, Barbosa M das GV, Coura JR, Arcanjo ARL, Nascimento A da S, Ferreira JM BB, 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.
 77. Monteiro WM, Barbosa M das GV, Toledo MJ de O, Augusto Fé F, Ferreira Fé N. Series of acute Chagas' disease cases attended at a tertiary-level clinic in Manaus, State Of Amazonas, from 1980 to 2006. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):207–10.
 78. Monteiro WM. Bases do diagnóstico microscópico da malária. 2020.
 79. Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, Prestes SR, Maciel MG, Da Silva GAV, et al. Trypanosoma cruzi strain Tc1 is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasites and Vectors.* 2014;7(1):1–7.
 80. Magalhães BML, Coelho LIARC, Maciel MG, Ferreira JM BB, 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.
81. Barbosa M das GV, Ferreira JM BB, 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 2013):27–33.
 82. 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.
 83. Coura JR, Junqueira ACV, Ferreira JM BB. Surveillance of seroepidemiology and morbidity of Chagas disease in the Negro River, Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(1):17–23.
 84. 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.
 85. Truyens C, Dumonteil E, Alger J, Cafferata ML, Ciganda A, Gibbons L, et al. Geographic Variations in Test Reactivity for the Serological Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Clin Microbiol.* 2021;59(12).
 86. Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, De La Soledad Lagunes-Castro M, 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. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2015;8(1):1–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1072-2>
 87. 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.
 88. 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.
 89. Coura JR, Junqueira ACV. Surveillance, health promotion and control of Chagas disease in the Amazon Region - Medical attention in the Brazilian Amazon Region: A proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(7):825–30.

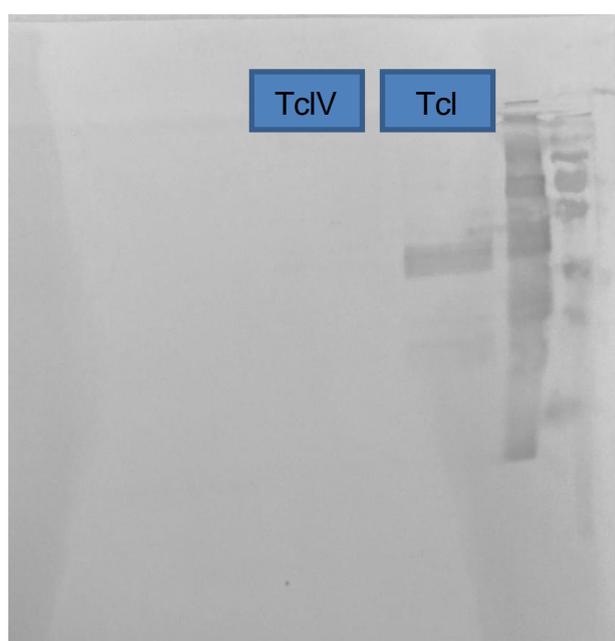
90. Rojas A, Vinhães M, Rodríguez M, Monroy J, Persaud N, Aznar C, et al. Reunião internacional sobre vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia. Implementação da Iniciativa Intergovernamental de Vigilância e Prevenção da doença de Chagas na Amazônia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(1):82–9.
91. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* : um parasita , dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas ? *Rev da Biol*. 2011;6b:44–8.
92. 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.
93. 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.
94. Perez-Fuentes R, Sanchez-Guillen M del C, Gonzalez-Alvarez C, Monteon 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.
95. Tarrant CJ, Fife Eh, Anderson RI. Serological Characteristics and General Chemical Nature of the in Vitro. *J Parasitol*. 1965;51(2):277–85.
96. Berrizbeitia M, Figueroa M, Ward BJ, Rodríguez J, Jorquera A, Figuera MA, et al. Development and application of an Elisa assay using excretion/secretion proteins from epimastigote forms of *t. cruzi* (esea antigens) for the diagnosis of chagas disease. *J Trop Med*. 2012;2012.
97. Affranchino JL, Ibañez CF, Luquetti AO, Rassi A, Reyes MB, Macina RA, et al. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;34(3):221–8.
98. Samuel goldenberd, Marco Aurélio Krieger, Juan J. Lafaille, Elza ALmeida WO. Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas' disease. *Mem Inst Butantan*. 1991;53:71–6.
99. Zingales B, Gruber A, Ramalho CB, Umezawa ES, Colli W. Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas disease. Vol. 85, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1990. p. 519–22.

100. Stolf MAS. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME KA. Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. Hemoterapia SB de H e, organizador. São Paulo; 1992.
101. Medeiros FC De. Guia para notificação de doença de Chagas crônica (dcc) e- sus notifica.

7. ANEXOS

7.1 Western blot in-house

Identificação das proteínas por eletroforese revelaram a presença de proteínas imunogênicas, onde o pool de soros chagásicos agrupados reconheceu os antígenos de excreção e secreção de ambos os isolados. No entanto só foi possível visualizar na linhagem TcI, enquanto TcIV não foi possível visualizar devido a sua baixa concentração de proteína.



Anexo. Testagem do pool de soros com DC utilizando a técnica Western blot in-house

7.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido -TCLE

Nós, Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, Jorge Augusto de Oliveira Guerra e Susan Smith Doria, pesquisadores da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), estamos convidando o senhor/a senhora/você/seu filho/seu familiar que teve resultado positivo para doença de Chagas crônica sintomáticos ou assintomáticos detectados em inquéritos sorológicos, doação de sangue e clínica cardiológica, a participar de um estudo chamado “Desenvolvimento *in house* de testes imunológicos, para o diagnóstico da doença de chagas crônica, utilizando linhagens de *Trypanosoma cruzi* circulantes no estado do Amazonas”.

- a) O objetivo desta pesquisa é desenvolver in house teste imunológico (ELISA e Western blot), utilizando antígenos das linhagens de *Trypanosoma cruzi* circulantes nas regiões do Estado do Amazonas;
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário a coleta de 10mL de sangue;
- c) É possível que, durante a participação na pesquisa o senhor/a senhora/você/seu filho/seu familiar experimente algum desconforto, principalmente relacionado à punção para a coleta de sangue;
- d) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: que o senhor/a senhora/você/seu filho/seu familiar apresente alergia à punção;
- e) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: que a gente tenha um novo teste com melhor sensibilidade para detecção da doença de Chagas crônica;
- f) Os pesquisadores Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, Jorge Augusto de Oliveira Guerra e Susan Smith Doria, responsáveis por este estudo estarão disponíveis na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), no horário de 8:00 a 17:00, para esclarecer dúvidas que o senhor/a senhora/você/seu filho/seu familiar possa ter e dar as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo;
- g) A sua participação neste estudo é voluntária e se o senhor/a senhora/você/seu filho/seu familiar não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e retirar o seu consentimento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma o seu atendimento, tratamento ou acompanhamento na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD);
- h) As informações relacionadas a este estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas. No entanto, se qualquer informação for divulgada garantimos que a identidade do senhor/da senhora/sua/de seu filho/de seu familiar será preservado e mantido em segredo.
- i) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos etc.) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- j) O senhor/a senhora/você/seu filho/seu familiar terá a garantia de que problemas como reação alérgica decorrentes do estudo serão assistidos, tratados e

acompanhados na FMT-HVD, sem qualquer gasto para o senhor/a senhora/você/seu filho/seu familiar, durante todo o tempo que for necessário. Da mesma forma, terão direito à indenização garantido caso ocorra algum dano permanente devido à participação nesse estudo;

- k) Os materiais coletados, o sangue, do senhor/da senhora/sua/de seu filho/de seu familiar serão utilizados exclusivamente para atender aos objetivos desta pesquisa e, caso haja sobra, será guardado uma alíquota da amostra no laboratório de entomologia de FMT-HVD, em caso de ser preciso a repetição do método.

Eu, _____, li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi tratou dos riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no item d). Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós. Sendo assim, eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal)

Manaus, _____ de _____ de _____

(Assinatura da testemunha)

Manaus, _____ de _____ de _____

Também fui informado de que há interesse em se guardar o material biológico coletado para estudos futuros e entendi as razões para isso, de forma que:

() Autorizo a guarda do material.

() Não autorizo a guarda do material.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste indivíduo ou de seu representante legal para a participação neste estudo

(Assinatura do Pesquisador)

Manaus, _____ de _____ de _____

7.3 Procedimentos operacionais padrão utilizados na dissertação

7.3.1 Procedimento para preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle para cultura de *Leishmania sp.* e *T. cruzi*

	<p>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_001		
TÍTULO: Procedimento para a preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN) para cultura de <i>Leishmania sp.</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>		
Elaborado por: Wuelton M. Monteiro Modificado por: Yolanda Noguth Jessica V. Ortiz Susan Smith Doria	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra	Data de aplicação Julho de 2018 Data da próxima revisão Julho de 2019

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento para a preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN) para cultura de *Leishmania sp.* e *Trypanosoma cruzi*.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

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 se aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

- 6.1.1 Pipetas sorológicas de 10mL
- 6.1.2 Tubos de ensaio com tampa de rosca
- 6.1.3 Balão de fundo chato
- 6.1.4 Proveta graduada de 1L
- 6.1.5 Erlenmeyer de 125mL
- 6.1.6 Pérolas de vidro
- 6.1.7 Dispensador automático

6.2 Equipamentos

- 6.2.1 Destilador
- 6.2.2 Câmara de fluxo laminar

Código	TÍTULO	Revisão	Página
POP_ENT_LB_001	Procedimento para a preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN) para cultura de <i>Leishmania</i> sp. e <i>Trypanosoma cruzi</i>	01	2

6.2.3 Banho-maria

6.2.4 Geladeira

6.2.5 Autoclave

6.2.6 Balança de Precisão

6.2.7 Agitador magnético

6.2.8 Estufa

6.3 Reagentes, meios e soluções:

6.3.1 BHI (Brain and Infusion Agar) ágar (Sigma P7278)

6.3.2 Gentamicina (10uL/mL)

6.3.3 Ágar destilada q.s.p.1L

6.3.4 Sangue estéril e desfibrilado de coelho.

7 PROCEDIMENTOS

7.1 Preparo das vidrarias

7.1.1 Esterilizar os tubos de ensaio com tampas rosqueáveis, erlenmeyer e as provetas em autoclavagem por 30 min a 121°C.

7.1.2 Secar a vidraria por dois dias na estufa.

7.2 Preparo do sangue de coelho

7.2.1 Cobrir o fundo de um Erlenmeyer de 125mL com pérolas de vidro com 2 a 3mm de diâmetro.

7.2.2 Autoclavar por 30min a 121°C e secar em estufa.

7.2.3 Colher assepticamente por punção cardíaca o sangue do coelho.

7.2.4 Transferir imediatamente o sangue para um erlenmeyer estéril com as pérolas de vidro.

7.2.5 Desfibrilar por 10min o sangue pela agitação contínua por meio de movimentos circulares.

7.3 Meio básico

7.3.1 Pesar 52g de BHI

7.3.2 Colocar o BHL em um balão de fundo chato.

7.3.3 Adicionar 1L de água destilada

7.3.4 Autoclavar por 15min a 121°C.

7.3.5 Resfriar em banho-maria a 40°C

7.3.6 Adicionar 100mL de sangue de coelho desfibrilado e estéril.

7.3.7 Manter o meio a 40°C em banho-maria controlado

7.3.8 Transferir o meio para os tubos de ensaio com tampa de rosca com o auxílio dispensador automático

7.3.9 Manter os tubos inclinados a 45 graus até a solidificação do meio

Código	TÍTULO	Revisão	Página
POP_ENT_LB_001	Procedimento para a preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN) para cultura de <i>Leishmania</i> sp. e <i>Trypanosoma cruzi</i>	01	3

7.3.10 Deixar em teste de esterilidade por 2 dias

7.3.11 Armazenar na geladeira a 4°C por até 30 dias

7.3.12 Quando pronto, colocar por 30min a 37°C no banho-maria para criar o líquido de condensação.

7.4 Meio completo

7.4.1 No momento do uso, deixar os tubos com ágar (meio básico) á temperatura ambiente até a estabilização da temperatura

7.4.2 Adicionar aos tubos com NNN suficiente quando de meio Schneider contendo 1% de soro fetal bovino e 80mg/mL de gentamicina para cobrir o bisel de ágar sangue.

7.3.2 Procedimento para obtenção de massa parasitária de *Trypanosoma cruzi*

		<p align="center">FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	
<p align="center">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_002</p>			
<p>TÍTULO: Procedimento para a obtenção de massa parasitária de <i>Trypanosoma cruzi</i></p>			
<p>Elaborado por: Susan Smith Doria</p>	<p>Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra</p>	<p>Data de aplicação Julho de 2018</p>	
		<p>Data da próxima revisão Julho de 2019</p>	

1. OBJETIVO

Descrever a obtenção da massa parasitária a partir de amostras crio preservadas em nitrogênio líquido de amostra de *Trypanosoma cruzi*.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico

5. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

- 6.1.1 Seringa de 1mL
- 6.1.2 Pipeta de 10mL
- 6.1.3 Garrafa de cultura de 50mL
- 6.1.4 Algodão embebido em álcool a 70%
- 6.1.5 Pipetas tipo Pasteur de vidro
- 6.1.6 Dispensador automático
- 6.1.7 Caixa de material com solução desinfetante
- 6.1.8 Frasco com álcool 70%

6.2 Equipamentos

- 6.2.1 Câmara de fluxo laminar
- 6.2.2 Estufa incubadora B.O.D (biochemical oxygen demand) a 26°C

Código POP_ENT_LB_002	TÍTULO Procedimento para a obtenção de massa parasitária de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Revisão 01	Página 2
--------------------------	--	---------------	-------------

6.2.3 Microscópio de câmara invertida

6.2.4 Centrífuga para tubos Falcon 50mL

6.3 Reagentes, meios e soluções:

6.3.1 Meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN)

6.3.2 Meio Schneider

6.3.3 Soro Fetal Bovino

7 PROCEDIMENTOS

Devem ser seguidas as normas de biossegurança do trabalho com *Trypanosoma cruzi* para realizar os seguintes procedimentos.

Deve ser usada uma capela de fluxo laminar para evitar contaminação.

7.1 Descongelamento das amostras

7.1.1 Descongelar as amostras de interesse e inocular em tubos contendo o meio NNN.

7.1.2 Transferir os tubos semeados para uma estufa B.O.D regulada a 26°C.

7.1.3 Observar seu crescimento em Microscópio de câmara invertida

7.2 Repique ao meio Schneider

7.2.1 Quando se observar um bom crescimento, realizar o repique em garrafas de cultura contendo 80% meio Schneider e 20% SFB.

7.2.2 Transferir as garrafas para uma estufa B.O.D regulada a 26°C.

7.2.3 Observar seu crescimento em microscópio de câmara invertida.

7.3 Massa parasitária

7.3.1 Quando se observar um bom crescimento, realizar o repique novamente para garrafas de cultura contendo 80% meio Schneider e 20% SFB. Este passo vai ser repetido até ter uma quantidade necessária para a experimentação correspondente.

7.3.2 No momento de ter a quantidade precisa, transferir o total para tubos falcon e centrifugar a 4,000g por 10min a 4°C

7.3.3 Descartar o sobrenadante para posteriormente utilização da massa a experimentação correspondente.

7.3.3 Procedimento para obtenção dos antígenos de excreção e secreção de *Trypanosoma cruzi*

	<p align="center">FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	
<p align="center">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_003</p> <p>TÍTULO: Procedimento para obtenção dos antígenos de excreção e secreção</p>		
<p>Elaborado por: Emily de Sousa Moura</p>	<p>Revisado e aprovado por:</p>	<p>Data de aplicação Maio de 2022</p>
<p>Modificado por: Susan Smith Dória</p>		<p>Data da próxima revisão Maio de 2023</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento para a obtenção dos antígenos de excreção e secreção

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

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 se aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

- 6.1.1 Pipetas sorológicas de 10mL
- 6.1.2 Garrafa de cultura de 25mL
- 6.1.3 Seringa de 10mL
- 6.1.4 Filtro millipore de 45um
- 6.1.5 Tubo falcon de 50mL

6.2 Equipamentos

- 6.2.1 Câmara de fluxo laminar
- 6.2.2 Estufa Incubadora (B.O.D) a 26°C
- 6.2.3 Centrífuga
- 6.2.4 Microscópio de câmara invertida

Código	TÍTULO	Revisão	Página
POP_ENT_LB_003	Procedimento para obtenção dos antígenos de excreção e secreção	01	2

6.3 Reagentes, meios e soluções:

6.3.1 Schneider

7 PROCEDIMENTOS

7.1 Meio para obtenção dos antígenos

- 7.1.1 Após a obtenção da massa parasitária, realizar 4 lavagens com 3mL de Schneider sem soro fetal bovino;
- 7.1.2 Ressuspender em 10mL de Schneider;
- 7.1.3 Transferir para a garrafa de cultura e deixar na B.O.D à 26°C à 3 dias ou 20 horas dependendo de cada cepa;
- 7.1.4 Observar seu crescimento por Microscópio de câmara invertida

7.2 Obtenção dos antígenos

- 7.2.1 Após 3 dias de crescimento, transferir para o tubo falcon
- 7.2.2 Centrifugar a 2.800g por 20 min a 4°C
- 7.2.3 Coletar o sobrenadante e filtrar
- 7.2.4 Realizar alíquotas do sobrenadante em microtubos
- 7.2.5 Armazenar a -80°C

7.3.4 Procedimento para preparação de PBS 1x

	<p align="center">FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	
<p align="center">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_004 TÍTULO: Procedimento para a preparação de 1L de PBS 20x</p>		
<p>Elaborado por: Susan Smith Doria</p>	<p>Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra</p>	<p>Data de aplicação Julho de 2018</p> <p>Data da próxima revisão Julho de 2019</p>

1. OBJETIVO

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. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico

5. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

6.1.1 Provera 1000mL

6.1.2 Garrafa de vidro limpa e seca para estocar reagentes de 1000mL

6.1.3 Bécker

6.1.4 Magneto

6.2 Equipamentos

6.2.1 Medidor de pH

6.2.2 Agitador magnético

6.2.3 Balança

6.3 Reagentes, meios e soluções:

6.3.1 água tipo I ou II

6.3.2 NaH₂PO₄ 24g

Código POP_ENT_LB_004	TÍTULO Procedimento para a preparação de 1L de PBS 20x	Revisão 01	Página 2
--------------------------	---	---------------	-------------

6.3.3 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ 4.423g

6.3.4 NaCl 170g

7 PROCEDIMENTOS

7.1 Preparação de PBS 20x

- 7.1.1 Utilizar a proveta para medir o volume de 500mL e transferir para o becker
- 7.1.2 Colocar no Becker uma barra magnética e colocar o Becker 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 por alguns minutos
- 7.1.6 Transferir o PBS 20x para garrafa. Etiquetar e aguardar na geladeira

NOTA: Para uma solução de PBS 1x é preciso 50mL de PBS 20x e 950mL

7.3.5 Procedimento para a preparação de tampão de bloqueio para o uso em ELISA

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_005 TÍTULO: Procedimento da preparação do Tampão de bloqueio para o uso em ELISA		
Elaborado por: Susan Smith Doria	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra	Data de aplicação Julho de 2018 Data da próxima revisão Julho de 2019

1. OBJETIVO

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

2. DEFINIÇÕES

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

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

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_004 Procedimento para preparação de 1L de PBS 20x

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

6.1.1 Pipetas de 10mL

6.1.2 Tubo falcon

6.2 Equipamentos

Não se aplica

6.3 Reagentes, meios e soluções:

6.3.1 POP_ENT_LB_004 Procedimento para preparação de 1L de PBS 20x

6.3.2 Soro Fetal Bovino (SFB)

Código	TÍTULO	Revisão	Página
POP_ENT_LB_001	Procedimento para a preparação do tampão de bloqueio para o uso em ELISA	01	2

7 PROCEDIMENTOS

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 cálculo para prepara o total necessário. É recomendável fazer 20mL, o uso do excedente pelo erro da pipeta.

7.1.1 Colocar num tubo Falcon 18mL de PBS 1x e adicionar 2mL de SFB (PBS 1x+10%SFB)

7.3.6 Procedimento para preparação de Tampão de carbonato para o uso em ELISA

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_006 TÍTULO: Procedimento para a preparação de Tampão de carbonato para o uso em ELISA		
Elaborado por: Susan Smith Doria	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra	Data de aplicação Julho de 2018 Data da próxima revisão Julho de 2019

1. OBJETIVO

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

2. DEFINIÇÕES

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

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

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 se aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

- 6.1.1 Becker
- 6.1.2 3 garrafas de vidro limpa e seca para estocar os reagentes
- 6.1.3 Magneto
- 6.1.4 Proveta

6.2 Equipamentos

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

6.3 Reagentes, meios e soluções:

- 6.3.1 Água destilada

Código POP_ENT_LB_006	TÍTULO Procedimento para a preparação de Tampão de carbonato para o uso em ELISA	Revisão 01	Página 2
--------------------------	---	---------------	-------------

6.3.2 NaHCO₃ 5,04g (para 100mL)

6.3.3 Na₂CO₃ 6,36g (para 1000mL)

7 PROCEDIMENTOS

7.1 Solução A Bicarbonato de Sódio

- 7.1.1 Utilizar a proveta para medir o volume de 500mL de água e transferir para o Becker
- 7.1.2 Colocar no Becker uma barra magnética e colocar o Becker numa agitadora sem aquecimento
- 7.1.3 Acrescentar 5,04g de NaHCO₃ e deixar em agitação até ser dissolvido
- 7.1.4 Colocar no Becker 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 volume de 500mL e transferir para o Becker
- 7.2.2 Colocar no Becker uma barra magnética e colocar o Becker numa agitadora sem aquecimento
- 7.2.3 Acrescentar 6,36g de Na₂CO₃ e deixar em agitação até ser dissolvido
- 7.2.4 Colocar no Becker o volume restante de 500mL
- 7.2.5 Deixar agitar por alguns 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 está em aproximadamente 9.6

7.3.7 Procedimento para preparação de Tampão de lavagem para o uso em ELISA

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_007 TÍTULO: Procedimento para a preparação do Tampão de lavagem para o uso em ELISA		
Elaborado por: Susan Smith Doria	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra	Data de aplicação Julho de 2018 Data da próxima revisão Julho de 2019

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento para a preparação de 1L de Tampão de lavagem

2. DEFINIÇÕES

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

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

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_004 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 Parafilme

6.2 Equipamentos

Não se aplica

6.3 Reagentes, meios e soluções:

- 6.3.1 POP_ENT_LB_004 procedimentos para preparação de 1L de PBS 20x
- 6.3.2 Tween 20

Código	TÍTULO	Revisão	Página
POP_ENT_LB_007	Procedimento para a preparação do Tampão de lavagem para o uso em ELISA	01	2

7 PROCEDIMENTOS

7.1 Tampão de lavagem PBS 1x+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 Parafilme na proveta e mexer o tampão
- 7.1.3 Colocar o tampão na garrafa de solução de lavagem na lavadora de microplacas

7.3.8 Procedimento para preparação do Tampão do OPD

		<p align="center">FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	
<p align="center">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP</p>			
<p align="center">POP_ENT_LB_008</p>			
<p>TÍTULO: Procedimento para a preparação do Tampão do OPD para o uso em ELISA</p>			
<p>Elaborado por: Susan Smith Doria</p>	<p>Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra</p>	<p>Data de aplicação Julho de 2018</p>	
		<p>Data da próxima revisão Julho de 2019</p>	

1. OBJETIVO

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

2. DEFINIÇÕES

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

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

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 se aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

- 6.1.1 Becker
- 6.1.2 Garrafas de vidro limpa e seca para estocar reagentes
- 6.1.3 Garrafa âmbar
- 6.1.4 Magneto
- 6.1.5 Proveta

6.2 Equipamentos

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

Código	TÍTULO	Revisão	Página
POP_ENT_LB_008	Procedimento para a preparação do Tampão do OPD para o uso em ELISA	01	2

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

7.1 Solução A Fosfato de sódio

- 7.1.1 Utilizar a proveta para medir o volume de 500mL e transferir o Becker
- 7.1.2 Colocar no Becker uma barra magnética e colocar o Becker em uma agitadora sem aquecimento
- 7.1.3 Acrescentar 1,19g de Na_2HPO_4 e deixar em agitação até está dissolvido
- 7.1.4 Colocar no Becker o volume restante de 500mL
- 7.1.5 Deixar agitar por alguns 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 volume de 500mL e transferir para o Becker
- 7.2.2 Colocar no Becker uma barra magnética e colocar o Becker na agitadora sem aquecimento
- 7.2.3 Acrescentar 1,19g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ e deixar em agitação até está dissolvido
- 7.2.4 Colocar no Becker o volume restante de 500mL
- 7.2.5 Deixar agitar por alguns 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
- 7.3.2.1 O pH deve estar entre 4.9 e 5.2

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

7.4 Parecer do CEP

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.948.579

Apresentação do Projeto:

Na proposta em análise pretende-se desenvolver testes sorológicos (ELISA e Western Blot) usando cepas T. cruzi TcI e TcIV em metodologias caseiras (in house), para a testagem nas amostras de pacientes com doença crônica, considerando-se que, entre as possíveis causas das discordâncias nos testes sorológicos, estão o estágio do parasito no momento da obtenção do antígeno, a preparação do antígeno, a reatividade cruzada, e que os testes comerciais utilizam linhagens que na maioria das vezes não é a mesma que se encontra na região endêmica.

Os kits comerciais para o ELISA, IFI ou mesmo Western Blot, são produzidos com linhagens de T. cruzi do tipo TcII, TcV e TcVI, pertencentes ao T. cruzi no seu ciclo doméstico, que até o momento ainda não foram encontradas na Amazônia.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.948.579

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 08 de Outubro de 2018

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))