



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Identificação e caracterização imunoquímica de antígenos de  
tripanosomatídeos envolvidos na reatividade serológica entre  
*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.**

**Silvia Tavares Donato**

**DISSERTAÇÃO PARA À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
NA ESPECIALIDADE PARASITOLOGIA.**

**MARÇO, 2023**





INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Identificação e caracterização imunoquímica de antígenos de  
tripanosomatídeos envolvidos na reatividade serológica entre  
*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.**

**Autor:** Silvia Tavares Donato

**Orientador:** Professor Doutor Marcelo Sousa Silva

**Co-orientador:** Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes

Tese apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade Parasitologia.



Copyright © em nome de Silvia Tavares Donato, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

O Instituto de Higiene e Medicina Tropical e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de cópias impressas, jogadas em papel ou em formato digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou a ser inventado e divulgar por meio de repositórios científicos e admitir sua cópia e distribuição com fins educacionais ou de pesquisa, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### Artigos Publicados (2)

1. Daltro, R. T., Leony, L. M., Freitas, N. E. M., Silva, Â. A. O., Santos, E. F., Del-Rei, R. P., Brito, M. E. F., Brandão-Filho, S. P., Gomes, Y. M., Silva, M. S., **Donato, S. T.**, Jeronimo, S. M. B., Monteiro, G. R. D. G., Carvalho, L. P., Magalhães, A. S., Zanchin, N. I. T., Celedon, P. A. F. and Santos, F. L. N. (2019) ‘Cross-Reactivity Using Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens: Diagnostic Performance in Settings Where Chagas Disease and American Cutaneous or Visceral Leishmaniasis Are Coendemic’, *Journal Clinical Microbiology*, 57(8). pii: e00762-19. doi: 10.1128/JCM.00762-19.

2. Moreno, Y. R., **Donato, S. T.**, Nogueira, F., Silva, M. S. (2019). ‘Serological Reactivity of Individuals with Clinical History of Malaria using Two Different ELISA Tests’, *Diagnostics*. 9(4), 168; doi.org/10.3390/diagnostics9040168.

### Capítulos de Livros Publicados (1)

1. Moreno, J. C. G., Oliveira, W. J. F., Branco, J.C., Araújo, L., Queiroz, M. A., **Donato, S. T.**, Júnior, J. N. S., Rodrigues, E. T. S., Silva, M. S. (2019), “Cultura celular e manutenção das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* para estudos de biologia parasitária”, De Souza, W. (Ed.) *Biologia de Trypanosoma cruzi*, IntechOpen, Londres, RU. doi: 10.5772/intechopen.84733.

### Apresentações em Congressos (5)

1. **Donato, S. T.**, Santos-Gomes, G., Silva, M. S. (2017), “Identificação e caracterização imunológica de antígenos de tripanosomatídeos envolvidos na reatividade serológica entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.”, poster apresentado na VIII Conferência Científica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

2. **Donato, S. T.**, Moreno, Y. R., Marinho, A. M. N., Santos-Gomes, G., Silva, M. S. (2017) “Identificação e caracterização de antígenos de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* envolvidos na sororeatividade cruzada no diagnóstico sorológico da Doença de Chagas e Leishmaniose”, poster apresentado no XXIV Congresso Latinoamericano de Parasitologia (FLAP 2017), Santiago, Chile.

3. Moreno, Y. R., **Donato, S. T.**, Nogueira, F., Silva, M. S. (2017) “Seroprevalência de *Plasmodium falciparum*: Identificação de antígenos como candidatos para o desenvolvimento de testes serológicos para a Malária”, poster apresentado no XXIV Congresso Latinoamericano de Parasitologia (FLAP 2017), Santiago, Chile.

4. Daltro, R. T., Leony, L. M., de Freitas, N. M. E., Del-Rei, R. P., Brito, M. E. F., Brandão-Filho, S. P., Gomes, Y. M., Silva, M. S., **Donato, S. T.**, Jeronimo, M. S. B., Monteiro, G. R. G., Zanchin, I. N. T., Carvalho, L. P., Magalhães, A. S., Celedon, P. A. F., Santos, F. L. N. (2019) “Avaliação da reatividade cruzada para proteínas quiméricas do *Trypanosoma cruzi* no diagnóstico da doença de chagas em indivíduos com leishmaniose tegumentar e visceral”, poster apresentado no 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e XXVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Belo Horizonte, Brasil.

5. **Donato, S. T.**, Santos-Gomes, G., Silva, M. S. (2019) “Identificação e caracterização imunológica de antígenos de tripanosomatídeos envolvidos na reatividade serológica entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.”, poster apresentado na VIII Conferência Científica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

.

*Está na natureza do homem exaurir todas as formas de uma ideia, ir até aos extremos, antes de prosseguir o curso normal de sua evolução.*

**León Denis**



## AGRADECIMENTOS

A Deus, senhor do universo, que nos governa, assiste, orienta e protege !

Ao meu orientador Marcelo Silva, pela orientação, assistência, paciência e investimento em nosso trabalho.

A minha mui querida co-orientadora, Profa. Gabriela Santos-Gomes pelo acolhimento em Lisboa, desde a chegada até os dias atuais. Meu muito obrigado, pela orientação, assistência e o carinho das correções sobre o que isto ou aquilo “contribuí para nossa felicidade” ! Sempre estará em meu coração e em minhas orações!

Ao Magnífico Reitor da Universidade Federal de Campina Grande, Prof. Dr. Vicemário Simões, pelo apoio, ajuda e acolhida! Meu muito obrigado!

A minha família, meus pais, Genaldo Donato e especialmente, minha mãe Neuman Donato, pelo cuidado constante e diário. Minhas irmãs, Síntia e Sínia Donato, pelo apoio incondicional. E meus sobrinhos, Roberta e Leandro, pela alegria de suas presenças e, especialmente, minha Laurinha, por fazer dos dias de dificuldades, dias coloridos!

A Alexandre Marinho, por estar sempre por perto, seja no Brasil ou em Portugal, oferecendo sua companhia, apoio e atenção diárias, contribuindo para meu bem-estar emocional e equilíbrio interior!

A Anderson Scardua, amigo sempre pronto a ouvir, aconselhar, orientar e tranquilizar-me em todos os instantes, desde a preparação até a finalização deste trabalho!

A minha colega de turma Samira Almeida, pela acolhida e assistência, além da companhia em nossas noites de estudo de helmintologia e entomologia!

A minha mui querida Yorleydy Ruiz, pela companhia diária no laboratório, orientação e ajuda. Grande amiga, sempre apoiando e nos momentos de folga íamos relaxar nas lojas de Lisboa!

Aos especialmente amigos Suetânia Gadelha e Júnior Freire por tornarem os dias difíceis mais fáceis, pelos finais de semana com vinho e muita alegria, sempre!

A minha amiga Renata Branco e ao Rogério Gomes, pela acolhida nos finais de semana, pelos churrascos nos jogos do Brasil, pelos jantares dos sábados à noite !

Aos meus amigos potiguares, Zeni Miranda pela acolhida e tantas e tantas músicas com Ivett Ortiz, seu marido Jorge e a linda Geórgia, com suas bonecas. Companhias agradáveis que faziam esquecer as dificuldades da rotina do laboratório, com muita conversa boa regada a alegria e vinho !

Aos meus colegas do laboratório de Imunoparasitologia da UFRN, muito especialmente Claudia Moreno, pela acolhida em Natal, orientação e companhia em todos os momentos; a Nilton Júnior pela companhia diária nos almoços e a Johnny Wisllas, pelas

orientações de estatística, pela assistência nas dificuldades e pelos cafés da tarde, diariamente !

A equipa da Divisão académica, do IHMT, Ana Varão, Ana Sá e Paula, pela assistência e orientação com presteza, sempre!

Ao António Pedro de Sá e Carlos Rodrigues do gabinete de informática do IHMT, pela assistência técnica e orientação informática sempre com atenção e deferência.

A equipa do grupo de estudos da Professora Gabriela no IHMT, minhas queridas Ana Bolas, Joana Marques, Sofia Mesquita Gabriel e Áurea Gabriel pela assistência, presteza, colaboração e carinho de todas!

A Profa. Dra. Maria das Graças do Laboratório Multiusuário (LabMulti) da UFRN, pela disponibilidade e assistência e aos queridos Jefferson, Saulo e Karla, pela presença amiga e alegre !

A Dra. Maria Gorete Lins de Queiroz e Bernadete de Souza Dantas, do Laboratório Central (LACEN) do Rio Grande do Norte pela cedência das amostras para a realização deste trabalho.

Aos Professores Arnóbio Silva e Matheus Pedrosa, pela liberação de uso dos equipamentos no Laboratório Tecbiofar e todos discentes que fazem seus grupos de pesquisa.

## RESUMO

As doenças tropicais negligenciadas, doença de Chagas e Leishmaniose Visceral, cujos agentes etiológicos são os protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*, respectivamente, exibem distribuição geográfica sobreponível e endemicidades semelhantes em diversas áreas. *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* pertencem à mesma família e compartilham repertórios de epítomos antigênicos com proteínas conservadas que podem ser responsáveis pela reatividade serológica cruzada no imunodiagnóstico da doença de Chagas e Leishmaniose Visceral. Reações serológicas cruzadas provocam alterações na precisão do imunodiagnóstico laboratorial destas doenças, podendo gerar distorções em inquéritos serológicos e estudos epidemiológicos. Este estudo realizou a caracterização antigênica e serológica cruzada em soros de indivíduos diagnosticados com a doença de Chagas e Leishmaniose Visceral. Por ELISA foi avaliada a seroreatividade antigênica de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* com a determinação do perfil serológico de anticorpos IgG totais anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania infantum* em amostras de soros de indivíduos com a doença de Chagas (n=240) ou Leishmaniose Visceral (n=240), respectivamente. A pesquisa da reatividade serológica cruzada foi feita por ELISA, quantificando anticorpos IgG totais anti-*Trypanosoma cruzi* em soros de Leishmaniose Visceral (n=240) e anticorpos IgG totais anti-*Leishmania infantum* em soros de doença de Chagas (n=240). Utilizou-se a técnica de *immunoblotting* para detetar frações proteicas de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* em soros de Leishmaniose Visceral e doença de Chagas, respectivamente. Anticorpos IgG totais anti-*Trypanosoma cruzi* foram detetados em 95,8% (230/240) de soros com doença de Chagas e anticorpos totais anti-*Leishmania infantum* foram detetados em 94,6% (227/240) de soros com Leishmaniose Visceral. Anticorpos IgG totais anti-*Leishmania infantum* foram detetados em 91,2% (219/240) de soros com doença de Chagas e anticorpos IgG totais anti-*Trypanosoma cruzi* foram detetados em 91,2% (219/240) de soros com Leishmaniose Visceral. Conclui-se que anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* reconhecem o antígeno *Leishmania infantum* tanto quanto anticorpos anti-*Leishmania infantum* reconhecem o antígeno *Trypanosoma cruzi*, em soros de indivíduos infetados com doença de Chagas e Leishmaniose Visceral. A pesquisa pela detecção de proteínas comuns aos parasitas analisados pode ser a diretriz para se chegar a um teste diagnóstico com a sensibilidade e especificidade desejadas e que não provoque seroreatividade cruzada entre o diagnóstico de doença de Chagas e Leishmaniose Visceral.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, ELISA, Reatividade serológica cruzada.



**ABSTRACT**

Neglected tropical diseases, Chagas disease and Visceral Leishmaniasis, caused by protozoa *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* parasites respectively, exhibit geographic distribution overlapping and endemicity. Besides, both protozoans belong to the trypanosomatidae family. Consequently, antigenic epitopes repertoire, mainly common conserved proteins, is believed to be responsible for the serological cross-reactivity between Chagas disease and Visceral Leishmaniasis. The immunodiagnostics' precision tests are changed by cross serological reactions. Thus, lead to distortions in serological surveys and epidemiological data analysis. This study carried out the antigenic and serological cross characterization in individuals' sera diagnosed with Chagas disease and Visceral Leishmaniasis. ELISA assay, the antigenic seroreactivity was used to determine the serological profile of total IgG antibodies anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-*Leishmania infantum* in serum samples from individuals with Chagas disease (n = 240) or Visceral Leishmaniasis (n = 240). The investigation of serological cross-reactivity was performed also by ELISA, quantifying total IgG antibodies anti-*Trypanosoma cruzi* in individuals' serums of Visceral Leishmaniasis (n = 240) and total IgG antibodies anti-*Leishmania infantum* in sera from Chagas disease individuals (n = 240). The *immunoblotting* technique was used to detect protein fractions of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* in sera of Visceral Leishmaniasis and Chagas disease, respectively. As result, total anti-*Trypanosoma cruzi* IgG antibodies were detected in 95.8% (230/240) of sera with Chagas disease and total anti-*Leishmania infantum* antibodies were detected in 94.6% (227/240) of sera with Visceral Leishmaniasis. The cross serological showed that anti-*Leishmania infantum* IgG antibodies were detected in 91.2% (219/240) of sera with Chagas disease and total anti-*Trypanosoma cruzi* IgG antibodies were detected in 91.2% (219/240) of sera with visceral leishmaniasis. This study concluded that anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies recognize the *Leishmania infantum* antigen, as well as anti-*Leishmania infantum* antibodies, recognize the *Trypanosoma cruzi* antigen, in sera from individuals infected with Chagas disease and Visceral Leishmaniasis. The identification of conserved proteins parasites implicated in cross-reactivity may be the guideline for the improvement of diagnostic tests. Therefore, desirable sensitivity and specificity and that do not cause cross-reactivity between the diagnosis of Chagas disease and Visceral Leishmaniasis.

**Keywords:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, ELISA, Serological cross-reactivity.



## ÍNDICE

Produção Científica.....	iii
Artigos publicados.....	iii
Capítulos de Livros publicados.....	iii
Apresentações em Congressos.....	iii
Epígrafe.....	v
Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Índice.....	xiii
Índice de Figuras.....	xv
Índice de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas, Siglas ou Acrónimos.....	xix
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1. Doença de Chagas.....	06
1.1.1. Epidemiologia da doença de Chagas.....	08
1.1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
1.1.3. Transmissão de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
1.2. Leishmanioses.....	20
1.2.1. Leishmaniose Visceral.....	21
1.2.2. Epidemiologia das Leishmanioses.....	22
1.2.3. <i>Leishmania infantum</i> .....	27
1.2.4. Mecanismos de transmissão de <i>Leishmania infantum</i> .....	31
1.3. Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas e Leishmaniose Visceral.....	32
1.3.1. Reatividade serológica cruzada no diagnóstico laboratorial da doença de Chagas e da Leishmaniose Visceral.....	37
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1. Delineamento experimental.....	47
3.2. Amostras de soros de indivíduos diagnosticados com doença de Chagas e Leishmaniose Visceral.....	48
3.3. Parasitas e cultivo celular.....	48
3.4. Produção de extratos proteicos totais de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania infantum</i> .....	50
3.4.1. Quantificação proteica dos extratos.....	51
3.4.2. Perfil eletroforético dos extratos proteicos por eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	53
3.5. Otimização de um imunoenensaio ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> e anti- <i>Leishmania infantum</i> .....	54
3.5.1. Determinação de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> e anti- <i>Leishmania infantum</i> por ELISA em soros de indivíduos infetados com doença de Chagas e Leishmaniose Visceral.....	56

3.6.	Identificação de antigénios envolvidos na reatividade serológica cruzada no diagnóstico da doença de Chagas e Leishmaniose Visceral por <i>immunoblotting</i> .....	59
3.7.	Análise Estatística.....	62
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>63</b>
4.1.	Cultivo dos parasitas e caracterização dos extratos proteicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania infantum</i> para otimização de ELISA.....	65
4.2.	Determinação de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> em indivíduos com doença de Chagas .....	68
4.3.	Determinação de anticorpos anti- <i>Leishmania infantum</i> em indivíduos com Leishmaniose Visceral .....	72
4.4.	Análise de reatividade serológica cruzada entre doença de Chagas e Leishmaniose Visceral: deteção de anticorpos anti- <i>Leishmania infantum</i> em indivíduos com doença de Chagas.....	75
4.5.	Análise de reatividade serológica cruzada entre doença de Chagas e Leishmaniose Visceral: deteção de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> em indivíduos com Leishmaniose Visceral .....	78
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>81</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>93</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>97</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>101</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>115</b>
	ANEXO I – Soluções e tampões utilizados em ELISA.....	117
	ANEXO II – Soluções, Tampões e corantes utilizados em <i>immunoblotting</i> .....	119
	ANEXO III – Densidades óticas dos soros analisados em ELISA.....	123

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Distribuição mundial da doença de Chagas.....	09
<b>Figura 2.</b>	Formas morfológicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
<b>Figura 3.</b>	Ciclo da vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	14
<b>Figura 4.</b>	Distribuição geográfica de Leishmanioses.....	24
<b>Figura 5.</b>	Número de casos endêmicos de Leishmaniose Visceral e número de casos importados reportados por país.....	24
<b>Figura 6.</b>	Formas morfológicas de <i>Leishmania</i> spp.....	28
<b>Figura 7.</b>	Ciclo da vida de <i>Leishmania</i> spp.....	29
<b>Figura 8.</b>	Desenho experimental.....	47
<b>Figura 9.</b>	Fluxograma do processo seguido desde o cultivo dos parasitas até o armazenamento dos extratos proteicos.....	51
<b>Figura 10.</b>	Soros controles utilizados.....	56
<b>Figura 11.</b>	Detecção de anticorpos IgG totais, anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> e anti- <i>Leishmania infantum</i> por ELISA <i>in house</i> .....	58
<b>Figura 12.</b>	Representação esquemática de <i>immunoblotting</i> para detecção de frações proteicas reativas aos anticorpos de soros de doença de Chagas .....	61
<b>Figura 13.</b>	Tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	66
<b>Figura 14.</b>	Promastigota de <i>Leishmania infantum</i> .....	66
<b>Figura 15.</b>	Perfil eletroforético de extratos de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania infantum</i> .....	68
<b>Figura 16.</b>	Reatividade serológica anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> (Tc- ELISA) de indivíduos com doença de Chagas de área endêmica brasileira.....	69
<b>Figura 17.</b>	Representação de Curva ROC para teste Tc-ELISA na pesquisa de anticorpos IgG totais em soros de indivíduos com doença de Chagas de área endêmica brasileira.....	70
<b>Figura 18.</b>	Grupos de reatividade serológica anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> (Tc-ELISA) de indivíduos com doença de Chagas de área endêmica brasileira.....	71
<b>Figura 19.</b>	Reatividade serológica anti- <i>Leishmania infantum</i> (Li-ELISA) de indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.....	72
<b>Figura 20.</b>	Representação de Curva ROC para teste Li-ELISA na pesquisa de anticorpos IgG totais em soros de indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.....	73
<b>Figura 21.</b>	Grupos de reatividade serológica anti- <i>Leishmania infantum</i> (Li-ELISA) de indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.....	74
<b>Figura 22.</b>	Reatividade serológica anti- <i>Leishmania infantum</i> (Li-ELISA) em indivíduos com doença de Chagas de área endêmica brasileira.....	75

<b>Figura 23.</b>	Representação de Curva ROC para teste Li-ELISA na pesquisa de anticorpos IgG totais em soros de indivíduos doença de Chagas de área endêmica brasileira.....	76
<b>Figura 24.</b>	Grupos de reatividade serológica anti- <i>Leishmania infantum</i> (Li-ELISA) de indivíduos com doença de Chagas de área endêmica brasileira.....	77
<b>Figura 25.</b>	Reatividade serológica anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> (Tc-ELISA) em indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.....	78
<b>Figura 26.</b>	Representação de Curva ROC para teste Tc-ELISA na pesquisa de anticorpos IgG totais em soros de indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.....	79
<b>Figura 27.</b>	Grupos de reatividades serológicas anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> (Tc-ELISA) em indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.....	79

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b>	Equivalência das nomenclaturas dos sub-grupos genéticos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	16
<b>Tabela 2.</b>	Diluições de BSA utilizadas na curva de calibração para quantificação de proteínas pelo Método de Bradford.....	52
<b>Tabela 3.</b>	Constituição dos géis de poliacrilamida.....	54



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU ACRÓNIMOS

APS	Persulfato de amónia
BCA	Proteína do ácido bicinchonínico
BSA	Albumina bovina sérica
CRP	Proteínas reguladoras do complemento
DAB	3,3'- diaminobenzidina
DAT	Teste de aglutinação direta
dC	doença de Chagas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	Drugs for Neglected Diseases <i>initiative</i>
DO	Densidade ótica
DTU	Unidade de tipagem discreta
EF1- $\alpha$	Factor de alongamento 1 $\alpha$
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
FBS	Soro fetal bovino
Gp 63	Glicoproteína 63
HAI	Reação de hemaglutinação
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HRP	Peroxidase de rábano
HSP	Proteínas de choque térmico
IMCT	Imunocromatografia
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
LC	Leishmaniose cutânea
LIT	Triptose infusão de fígado
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral antroponótica
LVZ	Leishmaniose visceral zoonótica
MASP	Proteínas de superfície associadas a mucina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Dicloridrato de o-fenilenodiamina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação de cadeia da polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildenodiamina



# **1.Introdução**



## 1.INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada, endêmica na maioria dos países latino-americanos (Ackermann *et al.*, 2012; Lidani *et al.*, 2019), causada pelo parasita hemoprotozoário *Trypanosoma cruzi*, incluído na ordem Kinetoplastida. O parasita é transmitido, principalmente, por vetores triatomíneos, porém, também por transplante de órgãos, transfusão sanguínea, ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas e por via transplacentária.

Calcula-se que cerca de 7 a 8 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infetadas por este parasita. Considerada uma das mais preocupantes doenças tropicais negligenciadas, são estimados 670 mil anos de vida perdidos por incapacidade, por ano, nas Américas (Shah *et al.*, 2014). Segundo estimativas recentes, cerca de 6 milhões de pessoas estão infetadas por *T. cruzi* na América Latina (Brossas *et al.*, 2017; Lidani *et al.*, 2019). Apresenta, nesta região, incidência anual de 30.000 novos casos, em média e 12.000 mortes anuais, além de cerca de 9.000 recém-nascidos serem infectados durante a gestação. Estima-se que em torno de 70 milhões de pessoas correm risco de contrair a doença por viverem em áreas de exposição (PAHO, 2022). Devido às novas tendências migratórias, a epidemiologia da doença mudou e é, atualmente, um problema emergente de saúde pública nos Estados Unidos e na Europa, especialmente em Espanha, que possui o maior número de imigrantes da América Latina (Abras *et al.*, 2016), bem como em outros países, como Canadá, Itália, Suíça, Suécia, Japão e Austrália (Díaz Lozano *et al.*, 2017; Lidani *et al.*, 2019).

A doença evolui com uma fase aguda onde os indivíduos apresentam elevada parasitemia com sintomas inespecíficos e a fase crônica, normalmente com baixa parasitemia. A fase crônica pode ser assintomática ou sintomática, quando os indivíduos apresentam patologia cardiovascular e/ou gastrintestinal. Em geral, o diagnóstico da doença é realizado na fase aguda, basicamente pelos métodos parasitológicos diretos, como o exame de sangue a fresco, esfregaço seco e esfregaço espesso. Na fase crônica geralmente são utilizados os métodos serológicos no diagnóstico laboratorial (Alessio *et al.*, 2018).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a utilização de duas técnicas imunológicas com princípios diferentes, no diagnóstico da infecção por *T. cruzi*. A presença de epítomos semelhantes entre os parasitas pode causar reatividades serológicas

cruzadas, podendo ser encontradas entre os protozoários Kinetoplastida, mais comumente entre *T. cruzi*, *Trypanosoma rangeli* e *Leishmania* spp.. Reações serológicas cruzadas ocorrem quando anticorpos de pacientes com infecções por parasitas de mesma parentalidade reagem com antígenos parasitários não purificados (Alvarez *et al.*, 2014, Mucci *et al.*, 2017). A reatividade cruzada entre parasitas protozoários, particularmente *T. cruzi* e *Leishmania* spp. é um fato muito preocupante no imunodiagnóstico da doença de Chagas (Santos *et al.*, 2016a).

Mais de 100 anos após sua descoberta, a doença de Chagas continua a ser um problema de saúde pública global emergente e uma ameaça ao desenvolvimento sócio-econômico de alguns países do mundo, principalmente, da América Latina. Com altos encargos médicos, econômicos e sociais, vários países na América Latina e em alguns países de alta renda têm desenvolvido esforços para deter a transmissão de *T. cruzi*. No entanto, uma questão bastante relevante no controle da doença é o diagnóstico. Indivíduos infetados não são identificados em tempo útil e, portanto, tratados, devido a falta de instrumentos e métodos diagnósticos acessíveis e eficazes. Porém, mesmo que o indivíduo tenha sido tratado, o sucesso do tratamento não pode ser avaliado como eficiente pela ausência de mecanismos que demonstrem que o diagnóstico foi feito de forma eficaz (Balouz *et al.*, 2017).

A leishmaniose constitui um grupo complexo de doenças tropicais negligenciadas presentes em mamíferos (de Freitas *et al.*, 2016), associadas a elevados níveis de mortalidade e morbidade. Em todo o mundo, são relatados em torno de 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença com incidência estimada em 2 milhões de casos novos anualmente (Ibarra-Meneses *et al.*, 2019) e 20.000-30.000 mortes, por ano (Dayakar *et al.*, 2019). Com mais de 12 milhões de pessoas infetadas, globalmente, está entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas. Endêmica em 99 países do mundo, 89 países para Leishmaniose Cutânea, 80 para Leishmaniose Visceral e 71, para as duas formas clínicas (cutânea e visceral). Nas Américas, a Leishmaniose Cutânea e a Leishmaniose Visceral estão presentes em 21 países, sendo 19 países endêmicos para Leishmaniose Cutânea e 13, para Leishmaniose Visceral (PAHO, 2022). Causada por parasitas protozoários, intracelulares obrigatórios, do gênero *Leishmania*, apresenta elevada prevalência em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo transmitida por insetos vetores flebotomíneos (Dayakar *et al.*, 2019) e, menos comumente, por

transfusão sanguínea, transmissão congênita ou compartilhamento de agulhas (Bezuneh, *et al.*, 2014).

As formas clínicas da leishmaniose humana incluem Leishmaniose Cutânea, Mucocutânea e Visceral. Leishmaniose Cutânea é causada por *Leishmania major* e *Leishmania tropica* no centro da Ásia e no Oriente Médio e por *Leishmanias* dos complexos *braziliensis* e *mexicana* nas Américas (Ghorbani e Farhoudi, 2018). A forma clínica com maior letalidade é a Leishmaniose Visceral ou kala-azar, causada tipicamente por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* no Velho Mundo e por *Leishmania infantum* no Novo Mundo (Carvalho *et al.*, 2018).

Leishmaniose Visceral tem distribuição mundial, sendo endêmica em 80 países que envolvem a Ásia, leste da África, América do Sul, região do Mediterrâneo e alguns países do continente Europeu (Ibarra-Meneses *et al.*, 2019). Em nível global, 90% dos casos de Leishmaniose Visceral são relatados em sete países, abrangendo Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (Porcino *et al.*, 2019).

Ocupando o terceiro lugar de relevância endêmica no mundo, está o Brasil, que também apresenta o maior número de notificação de casos de Leishmaniose Visceral das Américas. O aumento do número de casos tem ocorrido por causa da ascensão constante de cães infetados, que são considerados os principais reservatórios da doença (Dhom-Lemos *et al.*, 2019).

Comumente sistêmica, Leishmaniose Visceral, é uma doença que afeta órgãos internos como o fígado, o baço e a medula óssea (Carvalho *et al.*, 2018). Com taxa de mortalidade superior a 95%, um indivíduo acometido pela doença pode apresentar manifestações como, perda de peso, febre, anemia, pancitopenia, hepatoesplenomegalia e hiperpigmentação da pele, entre outras (Dayakar *et al.*, 2019).

O diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Visceral pode ser feito por meio de testes que permitam a detecção direta ou indireta do parasita *Leishmania infantum*. O diagnóstico direto pode ser realizado através de exames parasitológicos em amostras de aspirados de medula óssea, linfonodos ou baço, com a visualização microscópica de formas amastigotas do parasita e o diagnóstico indireto por testes serológicos (Carvalho *et al.*, 2018).

A maioria dos indivíduos infetados com leishmaniose que reside em áreas endêmicas, não demonstram sinais ou sintomas da doença (Ibarra-Meneses *et al.*, 2019), não sendo

diferente com grande parte dos indivíduos infetados com *Leishmania infantum*, residentes em áreas endêmicas de países no Novo Mundo. Os indivíduos e cães assintomáticos, podem contribuir sobremaneira para a presença constante do parasita em regiões endêmicas. A identificação de indivíduos assintomáticos com Leishmaniose Visceral é de extrema relevância para o controle da doença e o monitoramento de regiões endêmicas, o que pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle e tratamento. O diagnóstico clínico da doença é complexo pois algumas características clínicas são compartilhadas com outras patologias, como sejam, a febre tifoide, tuberculose e malária (Porcino *et al.*, 2019).

Os tripanosomatídeos flagelados, *T. cruzi* e *L. infantum*, apresentam distribuição geográfica que se sobrepõem em muitas áreas e compartilham endemicidades semelhantes. Partilham determinantes antigénicos e reações serológicas cruzadas que podem levar a consequências adversas na precisão do diagnóstico, podendo gerar resultados equivocados em inquéritos serológicos e estudos epidemiológicos (Araujo, 1986; Nasawa *et al.*, 2001; Caballero *et al.*, 2007). Assim, o presente estudo tem como objetivo principal procurar decifrar as proteínas parasitárias envolvidas na seroreatividade cruzada no imunodiagnóstico da doença de Chagas com a Leishmaniose Visceral.

### **1.1. Doença de Chagas**

Potencialmente fatal, a doença de Chagas é uma zoonose que pode ser transmitida pelo contacto com fezes/urina de insetos triatomíneos infetados com *T. cruzi*, transfusão de sangue, transplante de tecidos e órgãos, pelo consumo de alimentos e/ou bebidas contaminadas, por acidentes de laboratório e, ainda, de forma transplacentária (Santos *et al.*, 2016a).

O avanço da doença tem início com uma fase aguda com duração de 10 a 90 dias, caracterizada por uma elevada parasitémia, mas normalmente assintomática. Aproximadamente três meses após a infeção, o sistema imunitário do hospedeiro controla a parasitémia e os indivíduos atingem a fase crônica, caracterizada geralmente por elevados níveis de imunoglobulina G (IgG) anti-*T. cruzi* (Reis-Cunha *et al.*, 2014). Assim, na fase aguda, os tripomastigotas circulantes podem ser visualizados em esfregaços de sangue periférico e a maior parte dos indivíduos acometidos é

assintomática (Messenger *et al.*, 2015; Pérez-Molina e Molina, 2018). Os sintomas, quando presentes, incluem febre, edema palpebral unilateral (quando a conjuntiva for a porta de entrada, o sinal de Romanã), inflamação no local da inoculação (chagoma de inoculação), linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (Pérez-Molina e Molina, 2018). Nesta fase, o índice de mortalidade é muito baixo (< 1% dos casos) mas pode resvalar em derrame pericárdico, meningoencefalite e/ou miocardite grave. Quando ocorre mortalidade aguda, a maior frequência de casos ocorre em pacientes imunocomprometidos e lactentes. Mesmo que não ocorra tratamento, esta fase se resolve de forma espontânea na maioria dos acometidos (Messenger *et al.*, 2015; Pérez Molina e Molina, 2018). Após a fase aguda, segue-se a fase crônica, que de início é assintomática, com a maior parte dos indivíduos afetados permanecendo clinicamente indeterminados por toda a vida. Portanto, a fase crônica é caracterizada pela forma latente ou forma crônica indeterminada que ocorre em cerca de 60% dos casos (Messenger *et al.*, 2015).

A forma crônica indeterminada caracteriza-se pela seropositividade para *T. cruzi*, com ausência de sinais e sintomas clínicos de comprometimentos cardíacos e/ou digestivos, além de raio-x e eletrocardiografia do tórax normais (Pérez-Molina e Molina, 2018). Após um período de 10 a 30 anos, cerca de 20 a 30% dos pacientes infetados podem desenvolver síndromes cardíacas que são irreversíveis e potencialmente fatais como a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) e/ou a dilatação do trato gastrointestinal (megacólon e/ou megaesôfago), que caracterizam a fase crônica sintomática. A CCC precoce está tipicamente associada a desequilíbrios do sistema de condução dos impulsos elétricos cardíacos, principalmente no bloqueio fascicular anterior esquerdo e/ou bloqueio do ramo direito e contrações ventriculares prematuras. Quando o paciente é acometido por manifestações de maior gravidade as ocorrências envolvem bloqueio atrioventricular de alto grau, cardiomiopatia com dilatação progressiva, insuficiência cardíaca congestiva e taquicardia ventricular (Messenger *et al.*, 2015), aneurismas apicais e êmbolos em decorrência da formação de trombos ou aneurismas (Pérez-Molina e Molina, 2018).

A morte súbita quando relacionada a CCC é responsável por cerca de 30 a 65% de mortalidade e pode ocorrer em indivíduos que apresentem doença cardíaca terminal da mesma forma que os previamente assintomáticos. Em menor quantidade que as sequelas

cardíacas, as mega-síndromes são resultados de processos de desnervação, diminuição de motilidade, disfunção de esfíncter e possível dilatação no lúmen do esôfago e/ou cólon. Com o sistema imunitário sem controle, os parasitas anteriormente sequestrados em tecidos profundos multiplicam-se e retornam à circulação sanguínea. O processo de reativação da doença pode acontecer em pacientes infetados que tornam-se imunocomprometidos ou pela co-infecção com o vírus HIV. A reativação caracteriza-se pelo incremento da multiplicação parasitária, retornando aos elevados níveis de parasitemia, detetáveis pela microscopia, como também pelo retorno de sintomas típicos da fase aguda, como seja o chagoma (lesão cutânea saliente acompanhada de edema), a miocardite aguda e a meningoencefalite. A identificação da estirpe parasitária torna-se mais frequente em pacientes imunocomprometidos do que em pacientes imunocompetentes por conta das elevadas cargas parasitárias que facilita a detecção do parasita (Messenger *et al.*, 2015).

### **1.1.1. Epidemiologia da doença de Chagas**

Em 1994, a doença de Chagas afetava cerca de 16-20 milhões de pessoas no Continente Americano (Malchiodi *et al.*, 1994), contudo, estimativas de 2012, referiam que a doença atingia cerca de 10 milhões de pessoas que viviam em áreas endêmicas (Flores-Chavez *et al.*, 2012). Em 2015, as estimativas demonstravam cerca de 10 milhões de pessoas infetadas com *T. cruzi*, principalmente na América Latina, onde é endêmica e mais de 25 milhões de pessoas estavam em risco de contrair o parasita (Morais *et al.*, 2015). Dados atuais, indicam que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas se encontram infetadas em todo o mundo, prevendo-se 50.000 a 200.000 novos casos anuais (Diaz Lozano *et al.*, 2017; Lidani *et al.*, 2019). Esta parasitose causa morbidade em até 10 milhões e mortalidade em 14.000 pessoas no continente ocidental (Santos *et al.*, 2016a). Em 2018, a iniciativa Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DNDi) revela a distribuição da doença de Chagas em áreas reconhecidamente endêmicas como a região central e sul do Continente Americano, mas também em regiões não-endêmicas, como a América do Norte, o Continente Europeu e a Oceania (Figura 1).

Nas Américas, *T. cruzi* encontra-se presente desde o sul dos Estados Unidos da América (EUA) até a Patagônia Argentina (Messenger *et al.*, 2015), sendo transmitido por várias

espécies de três gêneros de triatomíneos: *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius* (Pérez-Molina e Molina, 2018), infectando cerca de oito ordens de hospedeiros mamíferos sinantrópicos, silvestres e domésticos (Messenger *et al.*, 2015). Esses gêneros de triatomíneos estão largamente distribuídos na América Latina, desde o México à Argentina e Chile, e habitam áreas florestais e mais secas (Pérez-Molina e Molina, 2018).

O deslocamento de imigrantes para áreas não endêmicas associado à existência de reservatórios animais pode dar origem ao surgimento e à re-emergência da doença de Chagas (Chikweto *et al.*, 2014). A doença de Chagas deixou de ser um problema de saúde apenas da América Latina para ser um problema global devido à questão migratória. De fato, estimativas de 2013, indicaram que 36,7 milhões de pessoas migraram da América Latina e do Caribe e passaram a residir em outras partes do mundo, sobretudo na América do Norte (Connors *et al.*, 2016).



**Figura 1. Distribuição mundial da doença de Chagas.** Países endêmicos e países reconhecidos como não endêmicos mas que apresentam a doença. Adaptado de DNDi, 2018.

A migração humana vem provocando mudanças na distribuição da doença de Chagas em países endêmicos e não-endêmicos, o que constitui um dos desafios atuais no combate a doença. A principal forma de transmissão do parasita é a vetorial, que ocorre predominantemente nas Américas. Considerada tipicamente como uma doença da pobreza, o risco de infecção está associado a habitações de áreas rurais com baixa qualidade de construção, com telhado de palmeiras e rachaduras nas paredes, entre outros, e para além disso, ocorre co-habitação com animais domésticos (no interior ou no espaço externo da casa) (Connors *et al.*, 2016).

Na América Latina, a doença de caráter eminentemente rural tem se transformado numa doença urbana devido à migração de parte da população de áreas rurais para áreas urbanas, associado ao aumento da pobreza. Com estimativas de 127 milhões de pessoas vivendo em condições inferiores a linha de pobreza em comunidades peri-urbanas e urbanas, aliado às condições de habitação precárias, a urbanização dos triatomíneos tem sido facilitada. Normalmente, os migrantes têm maior risco de contrair doenças infecciosas por causa da pobreza em que vivem e que os leva a migrar, além das desigualdades sociais e econômicas que enfrentam quando mudam de localidade (Connors *et al.*, 2016).

Os índices da doença de Chagas vêm persistindo devido a outros mecanismos de transmissão, principalmente a transmissão transplacentária, a transfusão sanguínea e com menor frequência, a ingestão oral. A possibilidade do parasita ser transmitido por diferentes mecanismos junto com o caráter crônico, em grande parte assintomático, da doença, e a ausência de tratamento acessível e efetivo para os pacientes, contribui para que a prevalência da doença de Chagas ainda seja elevada (Connors *et al.*, 2016).

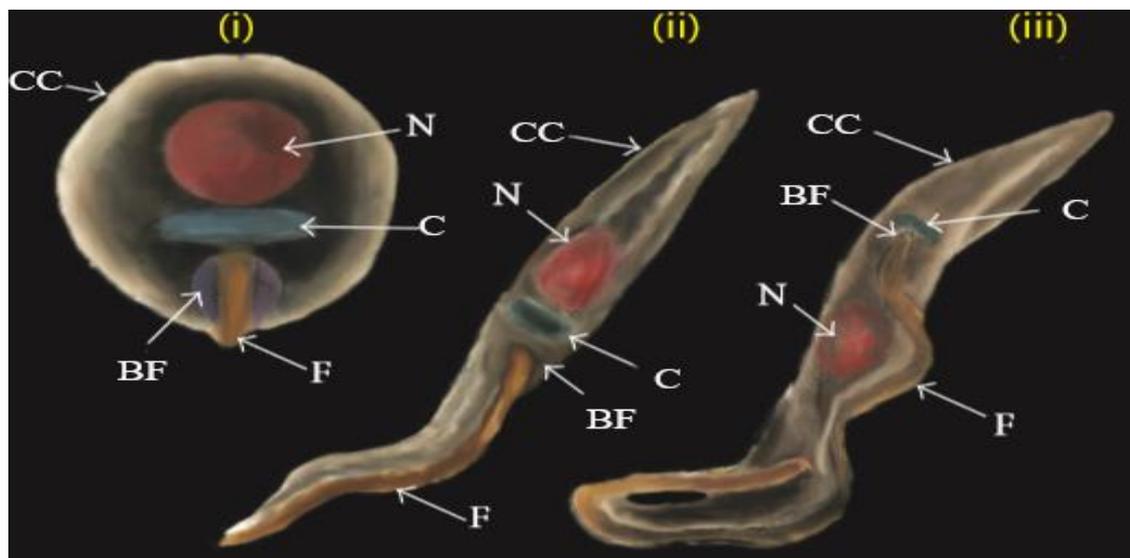
Alguns autores defendem que a transmissão transplacentária consiste na principal forma de transmissão de *T. cruzi* em áreas não endêmicas e seja responsável por 22% de novos casos anuais em países endêmicos com programas ativos para controlar a infestação por vetores domiciliares (Balouz *et al.*, 2017). No Brasil, a incidência de doença de Chagas por infecção oral gira em torno de 2 milhões de indivíduos cronicamente infetados. A co-existência de doença de Chagas com outras parasitoses favorece a existência de reações serológicas cruzadas o que dificulta o diagnóstico laboratorial. Assim, tem sido desenvolvido esforços continuados no desenvolvimento de testes laboratoriais de diagnóstico mais específicos e sensíveis (Santos *et al.*, 2016b).

### 1.1.2. *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas que pode afetar mais de 150 espécies de mamíferos silvestres e domésticos. É um protozoário heteroxênico da classe Kinetoplastida, ordem *Trypanosomatida* e família *Trypanosomatidae*, que circula entre hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (insetos). Os insetos vetores estão englobados numa grande variedade de espécies hematófagas da família *Reduviidae* (Perrone *et al.*, 2018).

O ciclo de vida do parasita encerra várias transformações morfológicas que envolvem os hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (insetos) onde verifica-se a presença de três diferentes estágios de desenvolvimento. São as formas morfológicas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (Figura 2) (Pech-Canul *et al.*, 2017).

As formas morfológicas de *T. cruzi* alternam-se em não infetantes e infetantes. As não infetantes são epimastigotas e amastigotas, porém, replicativas no intestino do inseto vetor e no interior das células dos mamíferos, respectivamente. A forma infetante é a tripomastigota, que não é replicativa mas apresenta dois estágios diferentes de desenvolvimento, as tripomastigotas de corrente sanguínea, presentes no sangue do vertebrado e as tripomastigotas metacíclicas, presentes no reto do inseto vetor (Pech-Canul *et al.*, 2017).



**Figura 2. Formas morfológicas de *Trypanosoma cruzi*.** Representação gráfica dos estádios de *T. cruzi*: (i) amastigota, (ii) epimastigota e (iii) tripomastigota, incluindo as estruturas internas: N = núcleo, C = cinetoplasto, BF = bolsa flagelar, F = flagelo, CC – corpo celular. Adaptado de Pech-Canul *et al.*, 2017.

As formas amastigotas apresentam formato arredondado ou oval, com um flagelo curto que não se exterioriza (Brener, 2003; De Souza, 1984). Formas epimastigotas, apresentam cinetoplasto anterior ao núcleo e cerca de 20 a 40  $\mu\text{m}$  de comprimento. Formas tripomastigotas apresentam cinetoplasto posterior ao núcleo e medem cerca de 25  $\mu\text{m}$  de comprimento e cerca de 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Tem sido observado que as tripomastigotas apresentam dois tipos morfológicos na corrente sanguínea: uma forma delgada, com núcleo alongado, cinetoplasto subterminal e flagelo curto e livre; e outra forma, larga, com núcleo oval, cinetoplasto quase terminal e flagelo longo e livre. O predomínio de uma forma morfológica sobre a outra depende da estirpe parasitária e do tempo de infecção. Estudos têm sugerido que as formas delgadas seriam as responsáveis pela infecção das células de vertebrados e as amplas, pela infecção dos invertebrados (Sousa, 2002).

A superfície celular do parasita é constituída por uma membrana plasmática e uma camada de microtúbulos. Os microtúbulos estão ligados entre si e a membrana plasmática por curtos filamentos. Esta conexão provavelmente é responsável pela rigidez celular e pelas dificuldades no rompimento da célula por métodos mecânicos. Os microtúbulos são estruturas ocas com a parede composta por 13 protofilamentos que tem cerca de 5 nm de espessura e diâmetro de 20 nm na parte central. O flagelo emerge de uma invaginação denominada bolsa flagelar. A proporção do comprimento total do flagelo no interior da bolsa flagelar vai variar de acordo com o estágio de desenvolvimento da forma morfológica. Sua estrutura básica, mostra padrão de 9 + 2 de microtúbulos axonemais.

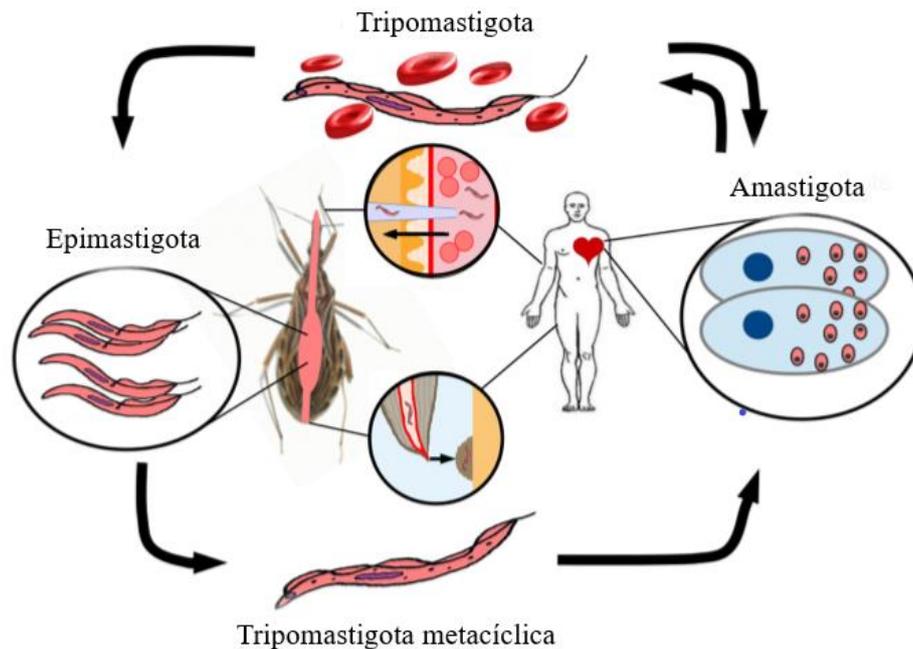
O cinetoplasto, localizado próximo da região basal do corpo celular, é a região rica em cromatina de uma mitocôndria composta por uma complexa matriz de fibrilhas de DNA e por material filamentososo ordenado numa linha de fibras super compactadas e orientadas de forma paralela ao eixo longitudinal do parasita. Aparecendo como um disco ligeiramente bicôncavo, o cinetoplasto tem cerca de 1,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,1  $\mu\text{m}$  de profundidade e é constituído por uma rede de 20.000 a 30.000 moléculas de minicírculos unidas umas as outras junto com grandes moléculas lineares. *T. cruzi* apresenta núcleo pequeno, com cerca de 2,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Modificações sucedem-se na organização do material nuclear no decorrer do processo de divisão nuclear. O

nucléolo pode ser encontrado no centro do núcleo ou ligeiramente excêntrico. Dispersa-se no momento da divisão nuclear, ressurgindo nas fases finais da mesma.

Estudos bioquímicos apontam a presença de proteínas associadas ao DNA do cinetoplasto de *T. cruzi*: Topoisomerase do tipo 2, Proteína ligante de origem de minicírculo, DNA polimerase Beta, proteína associada ao cinetoplasto, proteínas de clivagem, proteínas do choque térmico mitocondriais, proteína condensante de KDNA e grupo de proteínas ligante de cinetoplasto para ligamento de minicírculos e maxicírculos (Sousa, 2002).

O retículo endoplasmático e o complexo de golgi são visualizados no corpo do parasita. Em alguns casos, são localizados na periferia da célula estabelecendo contato com a membrana plasmática e com os microtúbulos. O núcleo apresenta uma membrana nuclear típica cheia de poros, sendo evidente a continuidade entre a membrana nuclear externa e o retículo endoplasmático. Nas formas epimastigotas, o núcleo tem forma arredondada e nas tripomastigotas, a forma é alongada e está situado na região central da célula.

Após o repasto sanguíneo num hospedeiro vertebrado infetado, tripomastigotas, ingeridas pelo inseto diferenciam-se em epimastigotas que se reproduzem intensamente no intestino médio do inseto. No intestino posterior, as formas epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas e são eliminadas junto com as fezes do inseto. Durante um novo repasto sanguíneo num hospedeiro vertebrado, ele também irá defecar na área próxima ao local da picada. Normalmente, a infecção ocorre por inoculação direta de tripomastigotas metacíclicas excretadas nas fezes do inseto a partir da pele lesionada, provocada pela picada do inseto. No interior do hospedeiro vertebrado, as tripomastigotas metacíclicas invadem as células hospedeiras no sítio de inoculação e diferenciam-se em formas amastigotas replicativas. Após um ciclo replicativo, as amastigotas intracelulares diferenciam-se em tripomastigotas intracelulares (Pech-Canul *et al.*, 2017). As formas tripomastigotas são libertadas, após lise celular, na circulação sanguínea, dispersando-se e infetando novas células de tecidos distantes. Nestes locais, as tripomastigotas voltam a diferenciar-se em amastigotas intracelulares que se multiplicam. O ciclo da vida (Figura 3) completa-se quando as formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas durante as refeições sanguíneas realizadas subsequentemente por vetores triatomíneos (Carrea e Diambra, 2016).



**Figura 3. Ciclo da vida de *Trypanosoma cruzi*.** O inseto vetor defeca tripomastigotas metacíclicas que penetram no hospedeiro vertebrado, onde invadem células e diferenciam-se em amastigotas. Após um ciclo replicativo, as amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas que irão para a corrente sanguínea. Um inseto ao realizar repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, ingere as tripomastigotas que, no intestino anterior do inseto, irão diferenciar-se em epimastigotas e a seguir, no intestino posterior, irão diferenciar-se em tripomastigotas metacíclicas, que são eliminadas junto com as fezes no momento do repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado e inseto vetor. Formas evolutivas: **Tripomastigotas** na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado; **Amastigotas** nas células e/ou tecidos do hospedeiro vertebrado; **Epimastigotas** no intestino médio do inseto vetor; **Tripomastigotas metacíclicas**, no reto do inseto vetor. Adaptado de Carrea e Diambra, 2016).

Caracterizado por notável heterogeneidade genética, *T. cruzi* atualmente é constituído por seis linhagens ou Unidades de Tipagem Discretas (DTUs), nomeadas de TcI a TcVI. Para além disso, estudos recentes sustentam a presença de mais uma linhagem, a sétima, designada TcBat (Roman *et al.*, 2018). Zingales e colaboradores, propuseram, em 2012, a seguinte nomenclatura para a identificação das DTUs de *T. cruzi*, assim como sua distribuição geográfica nas Américas:

- *T. cruzi* I (Tc I) – É a mais abundante das DTUs e a mais amplamente distribuída nas Américas. Apresenta-se nos locais de distribuição dos vetores triatomíneos, podendo participar em ciclos domésticos e silvestres. A infecção humana encontra-se

centralizada no norte da América do Sul e América Central e está associada a cardiomiopatia chagásica.

- *T. cruzi* II (Tc II) – É encontrada na região sul e central da América do Sul. A sua presença está relacionada com o ciclo doméstico. A infecção humana está associada a manifestações cardíacas e a síndromes do megacólon e megaesôfago.
- *T. cruzi* III (Tc III) – Encontrada no Brasil e países adjacentes. Está presente desde a Venezuela ocidental ao Chaco Argentino associada ao ciclo silvestre. A infecção humana tem sido relatada como rara. Ocasionalmente tem sido isolada de cães.
- *T. cruzi* IV (Tc IV) – Encontra-se na América do Sul com distribuição similar a Tc III, com exceção do Chaco Argentino, onde parece estar ausente. Ao contrário de Tc III, ocorre de forma bem frequente em humanos e é a segunda causa de doença de Chagas na Venezuela. Parece estar associada ao ecótopo arboreal.
- *T. cruzi* V (Tc V) – Presente na região sul e central da América do Sul. Está associada a ciclos de transmissão doméstica e parece ser rara em ciclos silvestres.
- *T. cruzi* VI (Tc VI) – Presente no Cone Sul, tem sido associada a casos humanos em ciclos domésticos de transmissão.

Acrescenta-se que, molecularmente, Tc V e Tc VI, são híbridos de Tc II e Tc III. No entanto, os marcadores genéticos não determinam se Tc V e Tc VI são resultantes de uma única ou de várias hibridizações seguidas de divergência clonal, e ainda, se a(s) hibridização(s) é (são) evolutivamente antiga (s) ou recentes (s).

Esta nova nomenclatura tem correspondência com os agrupamentos de *T. cruzi* anteriormente usados (Zingales *et al.*, 2009; 2012) (Tabela 1).

As DTUs de *T. cruzi* têm capacidade de infetar o Homem e algumas são mais frequentemente isoladas de amostras clínicas, como Tc I, Tc II, Tc V e Tc VI. As razões para essa distribuição não estão claramente definidas apesar de evidências atuais sugerirem que as estirpes parasitárias detetadas nos indivíduos refletem as DTUs que circulam entre os ciclos “domésticos/peridomiciliares” da área geográfica pertinente. A heterogeneidade genotípica do parasita também pode ser analisada a nível fenotípico ao se investigar parâmetros biológicos inerentes a *T. cruzi*, como a taxa de proliferação das formas epimastigotas no intestino médio do inseto vetor, a dimensão da diferenciação da forma epimastigota em tripomastigotas metacíclicas, além da forma morfológica que leva a infecção aos invertebrados (Balouz *et al.*, 2017).

**Tabela 1. Equivalência das nomenclaturas dos sub-grupos genéticos de *Trypanosoma cruzi*.**

DTU	Abreviatura	Agrupamentos anteriores
<i>T. cruzi</i> I	Tc I	Tc I, Z1, DTU I
<i>T. cruzi</i> II	Tc II	Tc II, Z2, DTU IIb
<i>T. cruzi</i> III	Tc III	Z3, Z1 ASATd, Z3-A, DTU IIc
<i>T. cruzi</i> IV	Tc IV	Z3, Z3B, DTU IIa
<i>T. cruzi</i> V	Tc V	Cepa Boliviana Z2, rDNA ½, Clonet 39, DTU IId
<i>T. cruzi</i> VI	Tc VI	Cepa Paraguaya Z2, Zimodema B, DTU IIe

A estirpe CL Brener foi utilizada como referência no “Projeto Genoma *Trypanosoma cruzi*”. Essa estirpe é um clone derivada da estirpe CL pertencente a linhagem Tc VI. Atualmente, com a sequência do genoma de CL Brener disponível, essa cepa tornou-se referência nos estudos para outros projetos e pesquisas. No estudo das proteínas de superfície de *T. cruzi*, as proteínas estudadas são comparadas com as do genoma CL Brener. Já foi demonstrada a importância biológica dessas proteínas de membrana, inclusive na relação parasito-hospedeiro (Pech-Canul *et al.*, 2017). *T. cruzi* apresenta uma superfície revestida por um denso glicocálix, tendo cada estágio de diferenciação uma composição característica, com a maior parte das glicoproteínas ancoradas a membrana por glicosilfosfatidil inositol (GPI). Grande parte dessas proteínas de superfície pertence a famílias multigênicas e estabelecem interações com os hospedeiros. As principais famílias multigênicas são (Berná *et al.*, 2017):

- **Proteínas *trans*-sialidase (TS)** – As formas tripomastigotas, apresentam a maior parte dos genes (268 genes) que codificam para estas proteínas supra-reguladas. Suas funções estão notadamente relacionadas com a invasão do parasita, com o escape do vacúolo parasitóforo, com a modulação da resposta imunitária do hospedeiro e com a apoptose. Tem massa molecular estimada de 67,6 kDa, variando entre 120 a 240 kDa.
- **Proteínas reguladoras do complemento (CRP)** - Trata-se de um subgrupo da família das *trans*-sialidasas cujos genes são sobreexpressos em tripomastigotas

- (70%), sendo específica da forma tripomastigota. Tem função relevante na restrição de ativação da via de complemento e na lise do parasita.
- **Proteínas de superfície associadas a mucina (MASP)** – Os genes que codificam estas proteínas encontram-se reguladas positivamente em tripomastigotas (97%). É considerada a segunda maior família multigénica de *T. cruzi*. Suas funções estão relacionadas a invasão e adesão do parasita a célula hospedeira.
- **Mucinas (MUC)** (também denominadas de proteínas semelhantes à mucina) - São a principal componente da membrana de *T. cruzi*. Na forma tripomastigota são codificadas por 25 genes que se encontram supra-regulados. Apresentam elevada quantidade e diversidade de glicanos com pesos moleculares mais elevados e suas funções estão relacionadas a ligação, penetração celular e evasão à resposta imunitária do hospedeiro.
- **Proteínas Gp63** - Estas proteínas são metaloproteases de superfície com caudas GPI, sendo reguladas em quantidades significativas em tripomastigotas. Suas funções estão direcionadas aos processos de adesão e invasão celular.
- **Família-1 de genes dispersos (DGF-1)** - Grupo de proteínas que se encontra bem representada na estirpe CL Brener. Porém, pouco se sabe sobre sua importância relativa ao processo infeccioso.

### 1.1.3. Transmissão de *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* pode ser transmitido aos seres humanos por meio da urina e/ou fezes de triatomíneos infetados, sugadores de sangue, transplantes de órgãos, transfusão sanguínea, via transplacentária ou ingestão de alimentos e/ou líquidos contaminados e, ainda, por acidentes de laboratório.

A principal via de transmissão da doença de Chagas é a vetorial, sendo o *Triatoma infestans* o triatomíneo que oferece maior risco como agente transmissor, devido as suas características antropofílicas. Estes insetos permanecem comumente em habitações rurais, podendo ser encontrados, juntos ou espalhados, ao redor das mesmas. As outras vias de transmissão, como a via transfusional, oral e transplacentária, apresentam importância equitativamente menor de transmissão entre os homens, porém, são as vias responsáveis pela urbanização e globalização da doença. Populações rurais afastadas de centros urbanos são as que apresentam os maiores índices de transmissão vetorial

devido ao acesso aos centros de saúde ser reduzido e complicado, além de que, dependendo da localidade, viajar para locais que ofereçam serviços mais diferenciados, por vezes é extremamente difícil (Mendicino *et al.*, 2014).

Vários esforços vêm sendo realizados nos últimos anos para controlar o processo de transmissão vetorial em países da América Latina e algum sucesso foi conseguido pela diminuição concomitante do número real de infecções agudas. Porém, como consequência direta da infecção por *T. cruzi* ser assintomática na grande maioria dos casos, indivíduos cronicamente infetados podem atuar como reservatórios dos parasitas durante toda a sua vida. Desta forma, com um grande número de indivíduos atuando como reservatório do parasita, parece ser consensual que a transmissão transplacentária de *T. cruzi* represente mais um problema de saúde pública que provavelmente se prolongará pelos próximos 20 anos. (De Marchi *et al.*, 2011).

Adicionalmente, os nascimentos, em algumas localidades de países de baixa renda, acontecem normalmente sem qualquer assistência médica, pelo que não existe a possibilidade de realizar testes laboratoriais para detetar precocemente a transmissão congénita em recém-nascidos. Além disso, em situações inesperadas em que é necessária uma transfusão de emergência (por exemplo, acidentes, desastres naturais e ferimentos por armas), dependendo da estrutura do centro de saúde da localidade, as pessoas são confrontadas com a escolha entre (i) o risco na demora provocado pela transferência do paciente ou (ii) o risco de utilizar sangue que não tenha sido rastreado para a infecção por *T. cruzi* (Mendicino *et al.*, 2014).

O risco de desenvolver doença de Chagas em consequência de transfusão de sangue infetado vem se tornando mais um problema, mesmo em áreas não endémicas e que já foi identificado nos Estados Unidos e na Europa. Devido ao risco de transmissão por transfusão sanguínea e transplante de órgãos infetados, nos últimos anos, os Estados Unidos vêm rastreando de forma rotineira as doações sanguíneas. Porém, o rastreio sistemático da infecção por *T. cruzi* em doadores ainda não se encontra estabelecido em muitos países de média-alta renda (De Marchi *et al.*, 2011).

Na América Latina, a transmissão por transfusão de sangue é considerada a segunda via mais importante de disseminação de *T. cruzi* e, em países industrializados, a mais importante. O parasita consegue resistir as condições de armazenamento de sangue, a baixas temperaturas, a congelamento e descongelamento, pelo que pode ser disperso a

todos os componentes sanguíneos (sangue total; concentrado de hemácias, leucócitos e plaquetas; plasma fresco congelado e crioprecipitado). Tem sido observado a presença de uma elevada carga parasitária nas plaquetas e isso leva a um risco maior de transmissão quando alguém é transfundido com concentrados plaquetários do que com plasma e sangue total. Porém, apenas uma pequena quantidade de indivíduos infectados por esta via de transmissão desenvolvem clinicamente a doença. Ao ser implementada a triagem universal de *T. cruzi* em bancos de sangue, o risco da transmissão da infecção por transfusão deverá ser reduzido drasticamente, estando estimado cerca de 1 infecção em 200.000 doações de sangue, mesmo em regiões endêmicas. Ressalta-se que a possibilidade da infecção ser transmitida por transfusão sanguínea depende de fatores como a quantidade de sangue transfundida, a presença de parasitemia no momento da doação, a estirpe do parasita, o estado imunitário do recetor e a sensibilidade dos ensaios diagnósticos utilizados para detecção do parasita, ou seja, quanto mais sensíveis forem os testes diagnósticos maiores serão as chances de detecção do parasita (Slavov *et al.*, 2017).

Em locais onde comumente não existem espécies de triatomíneos domésticos, a transmissão oral reveste-se de elevada importância como via de infecção secundária, sendo reconhecida como responsável por microepidemias regionais de doença de Chagas (Messenger *et al.*, 2015). Surtos recorrentes decorrentes da ingestão do parasita através de alimentos e bebidas contaminadas, tem chamado a atenção para a via da transmissão oral. Desde 2001, o número de casos agudos de doença de Chagas atribuídos à infecção por via oral tem aumentado e essa elevação de casos se reveste de mais importância devido ao consumo de triatomíneos por animais mamíferos silvestres pois constitui uma parte essencial do ciclo natural de transmissão do parasita (Lewis *et al.*, 2018).

O impacto que as vias de transmissão possuem sobre os resultados clínicos da doença de Chagas não é muito conhecido. Sabe-se que infecções adquiridas por transmissão vetorial pouco são diagnosticadas na fase aguda e mesmo as que o são, os sintomas normalmente são leves, sendo menos de 5% fatais; as demais, progridem para infecções crônicas ao longo do tempo. Em contrapartida, alguns casos de surtos por transmissão oral têm sido relacionados a sintomas inusitadamente graves e a elevadas taxas de

mortalidade, normalmente acima de 20%, levando a apreensões de que esta forma de transmissão seja mormente perigosa (Lewis *et al.*, 2018).

## 1.2. Leishmanioses

As leishmanioses estão incluídas entre as Doenças Tropicais Negligenciadas, sendo descritas como um grupo complexo de doenças provocadas por parasitas protozoários do género *Leishmania* e podem ocasionar, de acordo com a espécie, duas patologias distintamente, a Leishmaniose Tegumentar, responsável pela forma cutânea - e a Leishmaniose Visceral, causadora da forma visceral (Carvalho *et al.*, 2018). São um problema de saúde pública em todo o mundo com cerca de 1 a 1,5 milhões de novos casos por ano de formas cutâneas (Folgueira *et al.*, 2010) e 200 a 400.000 novos casos por ano de forma visceral (Carvalho *et al.*, 2018). Na totalidade de casos de leishmanioses, sem especificação das doenças, já foram relatadas anualmente 20.000 a 30.000 mortes e cerca de 0,9 a 1,3 milhões de casos novos (Chanmol *et al.*, 2019). Estão entre as doenças tropicais negligenciadas consideradas em expansão pela OMS por não existirem meios para que seu controle seja feito de forma eficiente (de Arruda *et al.*, 2016). São parasitoses endémicas em regiões tropicais e subtropicais, sendo a forma mais grave de leishmaniose, a Leishmaniose Visceral, causada pelos parasitas *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* (Folgueira *et al.*, 2010). A espécie *L. infantum* é considerada zoonótica na Europa, no norte da África, no médio oriente, na Ásia e na América Latina e a espécie *L. donovani*, antroponótica no subcontinente indiano e na África Oriental (Dhom-Lemos *et al.*, 2019).

No Brasil, *Leishmania (Leishmania) infantum*, considerada sinônima da espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi*, é responsável pela Leishmaniose Visceral (Assis *et al.*, 2008).

*Leishmania* é um parasita dixênico cujo ciclo de vida encerra a forma morfológica promastigota – extracelular – no inseto vetor e a amastigota – intracelular – em macrófagos do hospedeiro vertebrado. A transmissão ocorre de insetos vetores para um hospedeiro vertebrado pela inoculação de formas promastigotas metacíclicas (Chanmol *et al.*, 2019).

### 1.2.1. Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral é também conhecida como Calazar e febre Dum Dum (de Freitas *et al.*, 2016), apresenta 0,2 a 0,4 milhões de novos casos anuais, com 90% dos casos relatados ocorrendo predominantemente no Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (Bezuneh *et al.*, 2014).

Leishmaniose Visceral é transmitida ao homem pela picada de insetos flebotomíneos, sua taxa de mortalidade pode chegar até 100% em dois anos se não for tratada. Por ano, são cerca de 400.000 casos novos de Leishmaniose Visceral em todo o mundo (Sousa Filho *et al.*, 2016).

Os parasitas são transmitidos através da picada de insetos do género *Lutzomyia* (De Oliveira *et al.*, 2015) no Continente americano e do género *Phlebotomus* no Velho Mundo. Tendo canídeos como reservatórios, o principal reservatório doméstico de *L. infantum* é o cão (*Canis familiaris*) (Faria *et al.*, 2015; Farahmand e Nahrevanian, 2016). *Leishmania donovani* não tem reservatório animal conhecido, sendo o parasita transmitido entre a população humana através da picada do flebótomo.

A Leishmaniose Visceral, classificada também como uma zoonose por atingir os cães é comumente uma doença sistémica que acomete órgãos internos, comumente o fígado, o baço e a medula óssea, apresentando evolução crónica e, se não tratada, pode levar à morte em até 90% dos casos. Os indivíduos infetados desenvolvem a forma ativa da Leishmaniose Visceral por não conseguirem controlar o aumento dos parasitas e, com isso, podem manifestar formas graves e letais, especialmente quando estão associados à desnutrição e outras infeções concomitantes. Mas, uma quantidade significativa de indivíduos residentes em áreas endémicas consegue controlar a multiplicação dos parasitas e manter-se assintomático. Com isso, verificou-se que a quantidade de indivíduos que desenvolvem a doença sintomática gira em torno de 20% dos pacientes infetados e a grande maioria continua assintomática, questão que dificulta a deteção dos casos em análises epidemiológicas e investigações clínicas (Carvalho *et al.*, 2018).

Clinicamente, as manifestações da Leishmaniose Visceral podem variar desde a forma assintomática até o comprometimento visceral grave. Complicações por sangramento ou por co-infeções são as causas predominantes de desfechos fatais. O período de incubação dura em média dois a seis meses (Belo *et al.*, 2013). No Homem, os sintomas usuais, como, é o caso da febre, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, pancitopenia,

hipergamaglobulinemia e perda de peso não são específicos podendo ser confundidos com outras doenças (de Freitas *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019). As formas amastigotas estão adaptadas ao ambiente intracelular dos hospedeiros mamíferos e parasitam as células do sistema reticuloendotelial (ou sistema mononuclear fagocitário), incluindo baço, fígado, linfonodos e medula óssea. Os sintomas, quando surgem incluem, febre baixa de desenvolvimento lento, mal-estar generalizado, protusão do abdome em decorrência do aumento do fígado e baço e perda progressiva da visão com anemia. Outros sinais clínicos podem apresentar-se, tais como edema, principalmente de face, dificuldade na respiração, diarreia e sangramento de mucosas, entre outros. Caso não haja tratamento, o indivíduo pode ir a óbito em 2 a 3 anos, porém, nas formas agudas, pode acontecer por volta de 6 a 12 meses (Cunningham, 2002).

O *gold-standard* no diagnóstico laboratorial da leishmaniose permanece sendo a detecção do parasita pela visualização microscópica em biópsias de tecidos ou por cultura *in vitro* graças à sua elevada especificidade. Para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral, porém, exige-se a obtenção de aspirados de medula óssea, baço ou linfonodos, sendo procedimentos dolorosos e invasivos para os pacientes. Assoma-se que a sensibilidade das técnicas microscópicas e de cultura tendem a ser baixa e variável, dependendo de fatores, quais sejam a habilidade técnica do pessoal. Assim, o serodiagnóstico desponta como uma alternativa atraente, visto que, as infecções por *Leishmanias* são acompanhadas por uma considerável resposta humoral, particularmente na forma visceral. Procedimentos imunológicos vêm sendo desenvolvidos e adaptados para serem utilizados no diagnóstico e nas pesquisas epidemiológicas, assim é que diversas proteínas antigénicas têm sido expressas como proteínas recombinantes, sendo a proteína recombinante de *Leishmania* - rK39 - a utilizada em campo (Folgueira *et al.*, 2010). Os testes serológicos utilizados na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* são o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação direta (DAT) e imunocromatografia (ICT) (Bezuneh *et al.*, 2014).

### **1.2.2. Epidemiologia das Leishmanioses**

Tendo em conta o volume global da doença, as leishmanioses são consideradas a terceira doença mais importante de transmissão vetorial (Bezuneh *et al.*, 2014). Endémica em cerca de 98 países do mundo, está presente nos continentes

africano, americano, asiático e europeu (dos Santos Sales *et al.*, 2018). Há estimativas de que ocorram 1,5 a 2 milhões de casos novos por ano e que provoque 70.000 mortes, anualmente. Cerca de 350 milhões de pessoas em todo o mundo correm riscos de contrair a doença e entre 12 e 15 milhões estão infetadas (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Em 2012, a OMS promoveu uma estratégia para detetar casos de Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Cutânea (LC), com o intuito de descrever a distribuição e o ônus provocado pelas leishmanioses em 102 países, áreas ou territórios de todo o mundo. Dados de até 2010 indicavam que 90% dos casos de Leishmaniose Visceral em todo o globo ocorriam em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão e 70% dos casos de Leishmaniose Cutânea, no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Sudão e a República Árabe da Síria (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

Nas Américas, as leishmanioses, podem ser encontradas desde o sul dos Estados Unidos até às províncias da região norte da Argentina, exceto no Chile, Uruguai e El Salvador (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

Na América Latina, apresenta-se em 12 países, com cerca de 90% dos casos encontrados no Brasil, particularmente, na região Nordeste. No Brasil, a leishmaniose é encontrada na quase totalidade de seu território, com exceção da região Sul. A média anual, nos últimos 10 anos, é de 3.516 casos e a incidência de 2/100.000 casos por habitante. Ocorre mais comumente em crianças com idade abaixo de 10 anos e de forma proporcional afeta mais os homens que as mulheres (dos Santos Sales *et al.*, 2018).

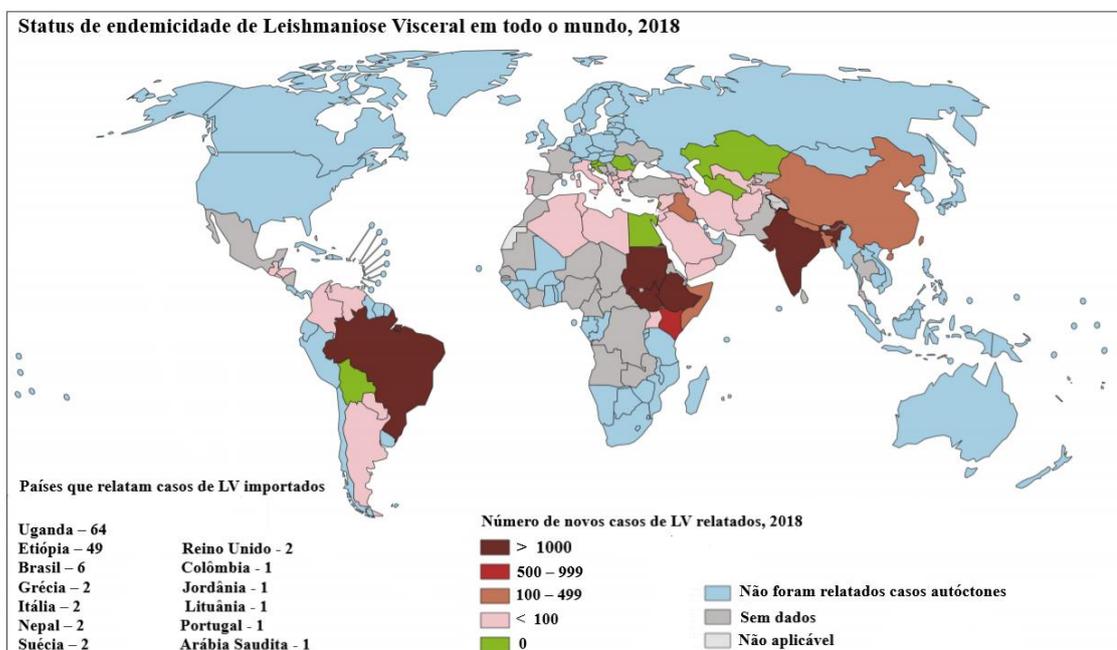
Dados de 2018, do Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DNDi), mostram um painel de distribuição com a presença de Leishmaniose Visceral no Continente Asiático, no Mediterrâneo, nordeste da África e América Latina, associados ou não a Leishmaniose Cutânea e de Leishmaniose Cutânea no sul do Continente Asiático, norte e nordeste da África e América do Sul (Figura 4).

Atualmente, a Leishmaniose Visceral está presente em 65 países de todo o mundo, com 90% dos casos concentrados no Nepal, Índia, Bangladesh, Sudão e Brasil (Figura 5). O Brasil concentra o maior número de casos da doença relatados nas Américas e é considerada a terceira área endêmica de Leishmaniose Visceral mais relevante de todo o mundo. O aumento do número de novos casos parece estar associado ao constante

crescimento da população de cães infectados com *L. infantum* (Dhom-Lemos *et al.*, 2019).



**Figura 4. Distribuição geográfica de Leishmanioses.** Países com Leishmaniose Visceral (VL), países com Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Visceral (CL + VL), países com Leishmaniose Cutânea (CL). Adaptado de Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi, 2018).



**Figura 5. Número de casos endêmicos de Leishmaniose Visceral e número de casos importados reportados por país.** As regiões que não reportam a infecção encontram-se também indicadas. Adaptado de World Health Organization (WHO, 2018).

Relatório técnico da OMS divulgado em 2012, relatou dados de Leishmaniose Visceral entre os anos de 2003 e 2008. Foram descritos a quantidade de casos anuais em países das regiões analisadas e a incidência estimada, respectivamente: no subcontinente indiano e sudeste da Ásia, foram 42.623 casos anuais e incidência de 162.100; no oriente médio foram 2496 casos e incidência de 5.000; na região mediterrânea foram 875 casos com incidência 1200; na África oriental foram 8.569 casos e incidência de 29.400 e em países entre a América Central e América do Sul, foram 3.668 casos por ano e com incidência anual estimada de 4.500 casos (Alvar *et al.*, 2012).

A Leishmaniose Visceral foi descrita na Europa em cerca de nove países e esses casos descritos retratam anualmente um índice menor que 2% da carga global. Os casos são relatados especialmente nos países do Mediterrâneo e uma propagação para o norte Europeu tem sido demonstrada. Essa propagação está sendo resultado de um conjunto de fatores como a migração de parasitas e vetores e as mudanças ambientais e climáticas (Bangert *et al.*, 2018).

A Leishmaniose Visceral tem duas formas de transmissão: a zoonótica, onde ocorre transmissão de *L. infantum* de um animal para um vetor e deste para um ser humano (Leishmaniose Visceral Zoonótica, LVZ) e a antroponótica, onde a transmissão de *L. donovani* ocorre de um humano para um vetor e deste para um humano (Leishmaniose Visceral Antroponótica, LVA). Na LVZ, o homem é hospedeiro e os canídeos, principalmente o cão doméstico, constituem o reservatório do parasita (de Freitas *et al.*, 2016). A espécie *L. donovani* é o agente etiológico da LVA no Continente africano e no subcontinente indiano e a espécie *L. infantum* é responsável pela LVZ na Europa, Norte da África e América Latina (Dhom-Lemos *et al.*, 2019). Os parasitas são transmitidos aos seres humanos e outros mamíferos através da picada de insetos fêmeas do gênero *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo) (Akhoundi *et al.*, 2016). O parasita *L. donovani* é transmitido, principalmente, pelo flebotomíneo *Phlebotomus argentipes*, no subcontinente indiano e na África Oriental, sem reservatório animal conhecido e *L. infantum* (sin. *chagasi*) é transmitido principalmente pela espécie *Lutzomyia longipalpis* e possui o cão e o homem como reservatórios (Singh e Sundar, 2015).

A principal fonte de parasitas *L. infantum* tanto na zona urbana quanto na região peridomiciliar é o cão doméstico. O animal, comumente, apresenta elevadas taxas de

infecção e parasitemia, além de capacidade de transmissão da infecção mesmo quando for assintomático. Leishmaniose Visceral indiferentemente de ser a humana ou a canina pode ser letal se o diagnóstico e tratamento não forem rápidos (Akhoundi *et al.*, 2016).

No Brasil, em áreas endêmicas, a maior parte dos indivíduos infetados com *L. infantum*, desde que não estejam imunossuprimidos, conservam-se assintomáticos. Os principais reservatórios da doença – os cães – por serem frequentemente assintomáticos representam um importante reservatório que contribui para a manutenção do parasita nas áreas endêmicas (Porcino *et al.*, 2019).

A maior parte das transmissões do parasita, no Velho Mundo, ocorre no ambiente peridoméstico em regiões semi-áridas modificadas pelos homens, ao mesmo tempo que no Novo Mundo, a transmissão está constantemente associada aos habitats silváticos, apesar de algumas espécies apresentarem transmissão eminentemente peridoméstica. A predileção pelo hospedeiro constitui um aspecto relevante que pode afetar o modo de transmissão da Leishmania por um vetor que pode acontecer entre pessoas, de animais para o homem e entre animais selvagens (Akhoundi *et al.*, 2016).

Estudos recentes vêm considerando que gatos e leporídeos (lebres e coelhos) podem atuar como prováveis reservatórios alternativos para o parasita em certos locais na região do Mediterrâneo (Reed *et al.*, 2016).

A transmissão de leishmaniose não é elevada em áreas desmatadas, sendo a espécie *Lutzomyia deleoni* descrita como a única isolada nesses habitats, por não ser uma espécie antropofílica. Desde a década de 1960, alguns estudiosos vêm enfatizando a potencial propensão dos vetores adaptarem-se a ambientes urbanos e suburbanos. Alguns fatores contribuem de forma importante na disseminação da doença, podendo ser relativos ao ambiente como desmatamento, mudanças climáticas, padrões de irrigação, alterações de temperatura e armazenamento de água ou aos indivíduos, como imunossupressão pelo vírus HIV, desenvolvimento de resistência a drogas, transplante de órgãos ou imunoterapia, crescimento de viagens para locais endêmicos, desastres naturais, importação de cães, populações com baixas condições socioeconômicas (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

Nessa questão de adaptação dos vetores a ambientes urbanos e semi-urbanos, os animais domésticos vêm desempenhando um novo papel, o de hospedeiros oportunistas. Esse novo modelo de dinâmica epidemiológica tem buscado explicação num conjunto

de fatos, como o aquecimento global, os desastres naturais e a destruição avançada, pelo homem do habitat natural dos insetos vetores. Definem as populações em riscos, os padrões de viagens dos indivíduos associadas ao turismo, os deslocamentos de populações por causa de guerras, os desastres naturais e as crises econômicas (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

Até os anos 1980 a Leishmaniose Visceral apresentava um padrão tipicamente rural e selvagem, mas o aumento considerável dos índices, denota a formação de um novo perfil epidemiológico devido a dispersão da doença nos centros urbanos (Castro-Júnior *et al.*, 2014). A incidência de Leishmaniose Visceral Zoonótica (LVZ) já foi relatada em regiões anteriormente não endêmicas onde o surgimento dos casos ocorreu pela presença de viajantes e imigrantes advindos de regiões endêmicas (Vallur *et al.*, 2015). Nos pilares de projetos para eliminação e diminuição dos índices de Leishmaniose Visceral estão a identificação dos hospedeiros parasitários, a detecção oportuna de casos para diminuição das taxas de mortalidade e as estratégias efetivas de controles de vetores nas áreas endêmicas (Santos *et al.*, 2019).

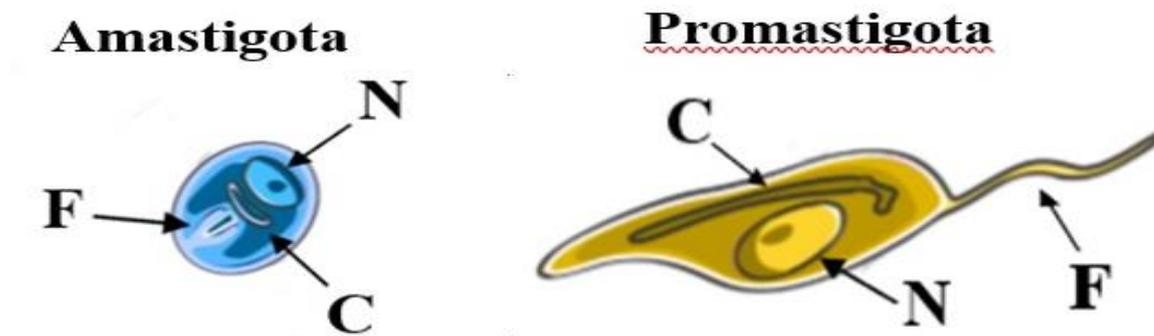
O diagnóstico precoce seguido do tratamento completo são fatores importantes para promover a diminuição da transmissão. Programas de controle conseguem diminuir a incidência, porém, os valores preditivos positivos diminuem mas o número de positivos aumentam assim é importante assegurar que o formato do diagnóstico e das técnicas utilizadas sejam adequados para que ocorra manutenção das prevalências locais. Portanto, a sustentabilidade das abordagens de controle da doença e a permanência dos índices de prevalências constituem os maiores desafios no contexto das leishmanioses (Singh e Sundar, 2015).

### **1.2.3. *Leishmania infantum***

O parasita protozoário *Leishmania infantum* pertence à família *Trypanosomatidae* que engloba microrganismos unicelulares reconhecidos pela presença de um flagelo único e de um cinetoplasto, uma região da mitocôndria rica em cromatina (Descoteaux e Turco, 1999).

Pertencente ao gênero *Leishmania*, apresenta um ciclo de vida dimórfico onde formas promastigotas extracelulares se multiplicam e se desenvolvem no trato alimentar do

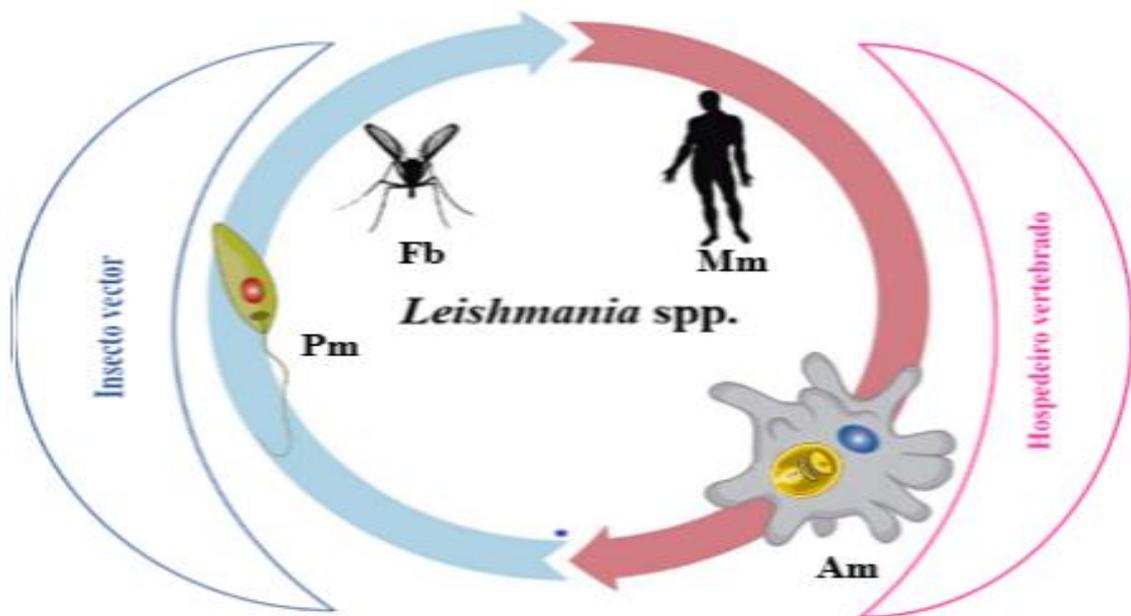
vetor flebotomíneo e formas amastigotas intracelulares (Figura 6) se multiplicam no interior de fagolisossomos dos macrófagos de hospedeiros vertebrados (Martins *et al.*, 2015). A forma promastigota, pode ainda, diferenciar-se em promastigota metacíclica que é não proliferativa mas infetante (Marchese *et al.*, 2018).



**Figura 6. Formas morfológicas de *Leishmania* spp..** Representação gráfica dos estádios morfológicos de *Leishmania* spp: Amastigota e promastigota, incluindo as estruturas internas: N = núcleo, C = cinetoplasto, F = flagelo. Adaptado de Marchese *et al.*, 2018.

A forma amastigota, é imóvel, com formato esférico, diâmetro aproximado de 2,5 a 5  $\mu\text{m}$ , sem flagelo exteriorizado (Cunningham, 2002) e a forma promastigota, é móvel, tem o corpo alongado, medindo entre 14 e 20  $\mu\text{m}$ , com flagelo livre na porção anterior (Descoteaux e Turco, 1999; Cunningham, 2002).

Os parasitas do género *Leishmania* spp. são transmitidos por flebotomíneos fêmeas que se infetam ao realizarem uma refeição sanguínea num mamífero infetado com o parasita (Fig. 7). No momento do repasto sanguíneo, os insetos ingerem macrófagos com amastigotas de *Leishmania* spp.. No tubo digestivo do inseto, durante a digestão, os macrófagos são lisados por enzimas hidrolíticas e as formas amastigotas libertadas. Os amastigotas diferenciam-se em promastigotas que iniciam um processo de replicação por divisão binária no intestino médio do flebotomíneo. Com o esgotamento dos nutrientes e com a diminuição do pH local, as formas promastigotas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas infeciosas mas não replicativas que se acumulam principalmente na válvula estomadeal. Durante a próxima refeição sanguínea do inseto fêmea infetado, as formas promastigotas metacíclicas serão inoculadas no mamífero.



**Figura 7. Ciclo da vida de *Leishmania* spp..** O ciclo de vida da *Leishmania* spp. inclui hospedeiros vertebrados, Mamíferos (Mm) e vetores invertebrados, Flebotomíneos (Fb) e as duas formas evolutivas: as formas **amastigotas** (Am) que ocorrem no hospedeiro vertebrado e que estão adaptadas para sobreviver e multiplicarem no ambiente intracelular dos macrófagos e as formas **promastigotas** (Pm) que se multiplicam no intestino do inseto vetor e é inoculado no mamífero no momento da refeição sanguínea do inseto vetor. Adaptado de Castanheira Bartholomeu *et al.*, 2014.

As células fagocitárias do mamífero são atraídas por componentes da saliva do inseto para a região da picada onde fagocitam os parasitas. No interior do vacúolo parasitóforo do macrófago, a célula hospedeira de *Leishmania*, as formas promastigotas metacíclicas diferenciam-se em formas amastigotas replicativas. Os amastigotas produzem proteínas que podem promover a modulação ou até mesmo a subversão do papel das enzimas líticas derivadas dos lisossomas, proporcionando a personalização do vacúolo parasitóforo como um nicho adequado à replicação parasitária, e conseqüentemente, facilita o estabelecimento da infecção. A libertação dos amastigotas por lise dos macrófagos e a fagocitose por outros macrófagos garante a expansão da infecção para os órgãos profundos. Quando um outro inseto fêmea não infetado com o parasita realiza uma refeição sanguínea no mamífero infetado, ingere células infetadas com as amastigotas completando o ciclo de vida do parasita (Marchese *et al.*, 2018).

Após 24 H do início da infecção, formas promastigotas transformam-se em formas amastigotas, no entanto, anticorpos específicos para as promastigotas permanecem no hospedeiro humano por bastante tempo mesmo após o tratamento. A presença do anticorpo no homem por tanto tempo só ocorre quando formas amastigotas dividem esses antígenos, ocasionando a produção de anticorpos por todo o período da infecção e isso foi confirmado através de análise de transcriptoma de proteínas amastigotas virulentas e avirulentas. Verificou-se que as seguintes proteínas foram encontradas nos dois estágios (promastigota e amastigota) de *Leishmania* (Ejazi *et al.*, 2018):

- **Glicoproteína de 63 kDa (gp63)** - é uma proteína conservada em todas as espécies de *Leishmanias* que se encontra em grande quantidade na membrana do promastigota. Trata-se de uma metaloprotease de zinco que é crucial na infecção e na sobrevivência do parasita no hospedeiro, sendo considerada um fator de virulência. Está envolvida com a captação de parasitas pelos macrófagos do hospedeiro além de promover a sinalização das células hospedeiras;
- **$\alpha$ -tubulina** - é um constituinte da rede de microtúbulos de *Leishmanias*, estando associada à forma, locomoção e divisão do parasita. Sendo uma proteína imunogénica, está indicada como possível candidata ao desenvolvimento de uma vacina contra a Leishmaniose Visceral;
- **Fator de Alongamento 1 $\alpha$  (EF1- $\alpha$ )** - é descrita como um fator de virulência no parasita, estando também implicada na resposta humoral induzindo a produção de anticorpos específicos. Desempenha um papel importante na síntese proteica.

Proteínas que apresentem boa imunogenicidade para linfócitos B podem ser utilizadas como biomarcadores no diagnóstico de Leishmaniose Visceral. Algumas proteínas presentes em parasitas e vetores hospedeiros já foram identificadas e analisadas quanto a verificação de suas respostas frente aos anticorpos do hospedeiro humano, com o intuito de serem utilizadas para fins de serodiagnóstico de Leishmaniose Visceral. Foram as: Proteínas de choque térmico (HSP) 83, rGRP78 e HSP70; Histonas leishmaniais como H2A, H2B, H3 e H4; outras proteínas nucleares como rlep2 e rpaplee22, proteínas ribossômicas rLiP2a, rLiP2b e rP207,8, enzimas rCisteína proteinase e rSignal peptidases, além de outras como rORFF e proteína Q (Ejazi *et al.*, 2018).

#### 1.2.4. Mecanismos de transmissão de *Leishmania infantum*

A forma clássica de transmissão do parasita ocorre pela picada de insetos flebotomíneos, no entanto, estudos realizados em Bangladesh, Espanha, França, Índia, Itália e Turquia demonstraram que os parasitas são encontrados entre doadores de sangue, indivíduos assintomáticos, o que sugere que a transfusão de sangue contaminado por *Leishmania* pode constituir-se numa fonte de transmissão da doença em paralelo com o compartilhamento de seringas e o transplante de órgãos (Fukutani *et al.*, 2014), ou seja, além da transmissão vetorial outras formas de transmissão, como a transfusão sanguínea, a injeção de drogas além da forma transplacentária, estão sendo catalogadas ao longo do tempo (Belo *et al.*, 2013; Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Embora raros, já há relatos de transmissão do parasita por acidentes de laboratório (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

A transmissão por transfusão sanguínea descrita em áreas endêmicas constitui uma fonte de preocupação pois doadores saudáveis não infetados assemelham-se a doadores infetados assintomáticos (Porcino *et al.*, 2019).

Estudos recentes têm avançado no conhecimento acerca da transmissão congénita do parasita onde pesquisas estão sendo realizadas em modelos animais. Até o momento, a via transplacentária é a única forma descrita para essa via de transmissão do parasita e estudos comprovam a capacidade do parasita em invadir a placenta e utilizar a via transplacentária baseando-se na demonstração de *Leishmania* em placenta, fetos e recém-nascidos. Até o momento apenas um caso de morte fetal foi relatado a partir de Leishmaniose Visceral materna, onde foi demonstrada a infecção da placenta por *Leishmania* (Berger *et al.*, 2017).

O primeiro relato sobre transmissão sexual de Leishmaniose Visceral, descrito em 1960 (Symmers) ocorreu numa paciente no Reino Unido. No caso, foi descrito que uma mulher, que nunca esteve no exterior, que residia numa zona sem vetores ou casos autóctones da doença, apresentou lesões genitais com amastigotas de *L. infantum*. A investigação demonstrou que o marido da mesma havia sido infetado, doze anos antes, com o parasita, em viagem ao Sudão (Oliveira *et al.*, 2015).

No Novo Mundo, as transmissões estão constantemente associadas aos habitats silváticos, apesar de algumas espécies apresentarem transmissão eminentemente doméstica, ao passo que no Velho Mundo, a transmissão ocorre em sua grande maioria

em ambiente peridoméstico de regiões semiáridas, modificadas pelo homem. A preferência pelo hospedeiro por parte do parasita também constitui um fato importante que atinge a forma de transmissão do mesmo, ou seja, a preferência por um vetor que esteja entre animais silváticos ou um vetor de animais para o homem e ainda um vetor que esteja entre os humanos (Akhoundi *et al.*, 2016).

### **1.3. Diagnóstico Laboratorial da doença de Chagas e Leishmaniose Visceral**

Os métodos utilizados para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas dependem do estágio da doença. O primeiro estágio é a fase aguda, em que a parasitemia é patente e pode ser detetada por técnicas parasitológicas convencionais, como é o caso da observação microscópica do parasita em esfregaços de sangue ou do xenodiagnóstico. Na maioria dos casos agudos, a infecção não é diagnosticada porque os sintomas não são evidentes, assim, o paciente entra no segundo estágio, a fase crônica indeterminada que pode abranger a vida útil em 70% dos casos (Besuschio *et al.*, 2017). O número de parasitas no sangue periférico durante a fase crônica da doença é baixo, o que dificulta o isolamento e a detecção do parasita. Devido à baixa sensibilidade dos exames parasitológicos, normalmente a doença é diagnosticada por meio de técnicas serológicas, como o teste de imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, ensaio de imunoadsorção imunoenzimática (ELISA), *immunoblotting* e imunocromatografia. Para um resultado conclusivo, é necessário que pelo menos dois testes serológicos diferentes sejam positivos (Teixeira-Carvalho *et al.*, 2015).

Com a ausência de um teste de referência, que apresente elevada especificidade e sensibilidade (Mucci *et al.*, 2017) associado à variabilidade antigénica do parasita, as diretrizes da OMS recomendam que pelo menos dois testes serológicos baseados em antígenos distintos sejam aplicados de forma consistente para que um diagnóstico seja considerado conclusivo (Besuschio *et al.*, 2017). O recurso a uma terceira técnica deve ser efetuado em caso de resultados ambíguos ou discordantes (Alvarez *et al.*, 2014), Mucci *et al.*, 2017).

O reconhecimento de anticorpos anti-*T. cruzi* ainda constitui o método mais eficaz para se demonstrar a exposição direta de um indivíduo ao parasita. A OMS a muito que destaca a necessidade da utilização de antígenos bem definidos como uma maneira de

melhorar o diagnóstico serológico da doença de Chagas. Para serem eficientes, os antígenos delineados devem satisfazer alguns critérios, tais como: (i) estarem presentes em isolados do parasita provenientes de diversas áreas endêmicas, (ii) não apresentarem outros agentes infecciosos, (iii) apresentarem elevada imunogenicidade em populações com diversas origens genéticas, (iv) serem estáveis e (v) serem naturalmente passíveis de ensaios de controle de qualidade como forma de garantir a reprodutibilidade do teste (De Marchi *et al.*, 2011).

A maior parte dos fabricantes de testes serológicos para doença de Chagas afirma que os testes proporcionam níveis de sensibilidade e especificidade próximos de 100%. Contudo, a presença de resultados inconclusivos e a detecção de falso-positivos é recorrente, sobretudo, se os títulos serológicos estiverem próximos do *cut off*. Para além disso, a variação existente entre os diferentes métodos disponíveis e laboratórios provavelmente está relacionada com a utilização de diferentes estirpes de *T. cruzi*, diversas frações antigénicas e procedimentos variáveis, além da diferença entre a capacidade imunogénica da estirpe parasitária utilizada em cada teste e a variabilidade na resposta humoral desenvolvida por cada indivíduo durante o processo infeccioso. Quando o indivíduo apresenta co-infecção com outros agentes patogénicos, particularmente com *Leishmania*, a probabilidade de ocorrência de reatividade cruzada limita a especificidade do resultado serológico, o que é considerada uma desvantagem importante para o diagnóstico serológico de doença de Chagas, principalmente em áreas endêmicas para os parasitas, *T. cruzi* e *Leishmania* spp. (Riera *et al.*, 2012).

Atualmente, a técnica serológica mais utilizada no diagnóstico da doença de Chagas é o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). Dependendo do *cut off* e do antígeno empregado, o teste pode apresentar sensibilidade e especificidade elevada e, além disso, tem capacidade de processar rapidamente grandes quantidades de amostras (Santos *et al.*, 2012). Devido ao seu bom nível de automação e flexibilidade, proporciona a utilização de diferentes preparações de antígenos (Santos *et al.*, 2016a). A utilização de proteínas recombinantes quiméricas, especialmente desenhadas no intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade do ensaio tem vindo a ser considerada (Santos *et al.*, 2017). No entanto, a utilização de antígenos brutos produzidos em laboratório tem sido tido em conta como candidatos antigénicos em testes serológicos para o rastreamento da infeção por *T. cruzi* e *L. infantum*. Formas epimastigotas (Flores-Chávez *et al.*, 2010) e

tripomastigotas de *T. cruzi* (estirpe y) (Santos *et al.*, 2012) têm sido investigadas ao longo dos anos como candidatas a antígenos passíveis de serem utilizados na identificação de soros positivos para a doença de Chagas. As dificuldades na produção de testes de diagnóstico que incluam marcadores apropriados para os mais variados cenários epidemiológicos da doença de Chagas aumentam, em conta da variação genética de *T. cruzi*, das fases da doença e das diferentes formas de transmissão (Besuschio *et al.*, 2017).

De acordo com a constituição do antígeno utilizada, os testes serológicos apresentam desempenho inferior ao desejado na detecção de populações chagásicas e os resultados discordantes entre testes encontram-se associados à localização geográfica dos pacientes envolvidos. A relação entre distribuição geográfica dos envolvidos e a discordância nos resultados pode ser atribuída à variação da resposta imunitária dos pacientes e à composição antigênica diferente entre as DTUs e suas prevalências em diferentes locais endêmicos. Ressalta-se que até o momento nenhum dos testes serológicos existentes pode ser considerado como *gold-standard test* (Balouz *et al.*, 2017).

O diagnóstico das leishmanioses baseia-se em características clínicas, resultados de exames laboratoriais e dados epidemiológicos. É essencial realizar o diagnóstico precoce das leishmanioses para evitar a ocorrência de danos permanentes, sequelas e até mesmo a morte do indivíduo, dependendo da forma da doença. Apesar da detecção do parasita confirmar o diagnóstico, a ausência de detecção não irá excluir a presença da infecção ou da doença (Celeste *et al.*, 2014).

O índice de mortalidade da Leishmaniose Visceral é elevado quando não ocorre tratamento, associado à dificuldade do diagnóstico clínico, uma vez que as manifestações clínicas são inespecíficas (febre prolongada, hepatoesplenomegalia, caquexia e anemia), podendo corresponder a sintomas característicos de outras doenças. O procedimento de diagnóstico laboratorial considerado *gold-standard* é a confirmação da infecção através de exames parasitológicos. Esses exames podem ser efetuados por microscopia ótica de amostras, coradas por Giemsa. Usualmente é utilizada amostra de aspirado de medula óssea e, mais raramente, aspirado esplênico e de linfonodo. A aspiração esplênica é um procedimento com elevado risco de provocar uma séria hemorragia ou ser fatal em um baço já aumentado, enquanto as amostras dos linfonodos e medula óssea possuem menor sensibilidade que as do aspirado esplênico. São técnicas

invasivas, incômodas, demoradas e exigem pessoal treinado e especializado (Bezuneh *et al.*, 2014).

Os testes parasitológicos apresentam precisão elevada, porém são trabalhosos e têm baixa sensibilidade. As técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstram elevada sensibilidade na detecção do DNA de *Leishmania*, sobretudo se o gene alvo for uma sequência de DNA do cinetoplasto que está presente em várias cópias. Contudo, essas técnicas moleculares nem sempre são utilizadas como rotina, em virtude de sua complexidade técnica, além de exigir mão-de-obra especializada e equipamentos adequados. Assim, os testes serológicos são utilizados rotineiramente no diagnóstico de Leishmaniose Visceral, nomeadamente ELISA, o ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste de aglutinação direta (DAT) (Celeste *et al.*, 2014).

A identificação de anticorpos anti-*Leishmania* é o primeiro passo para detetar uma infecção assintomática por *L. infantum*. As respostas dos anticorpos diminuem com o tempo, paralelamente ao desenvolvimento da resposta imune celular, assim, respostas serológicas a *Leishmania* direcionam para a presença de uma infecção aguda, seja na presença ou não de sintomas (Fukutani *et al.*, 2014).

A detecção serológica de anticorpos anti-leishmaniais incluem os testes ELISA, RIFI, DAT e imunocromatografia baseado na utilização de antigénio recombinante rK39 (Bezuneh, A. *et al.*, 2014). Alguns estudos mostram que estratégias ativas de detecção de casos proporcionam aumento na identificação precoce de Leishmaniose Visceral e diminuem os atrasos no diagnóstico e, conseqüentemente, no tratamento. Verifica-se a utilização crescente de testes rápidos que utilizam rK39 para detetar anticorpos anti-*Leishmania* (Banjara *et al.*, 2012).

O princípio de detecção de anticorpos contra antigénios parasitários utilizado nos testes serológicos convencionais para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral têm limitações inerentes ao próprio princípio, especialmente no diagnóstico da doença ativa. As restrições constituem em: *i*) Tanto quanto na doença ativa, na doença assintomática os níveis de anticorpos são de um modo geral elevados; *ii*) Os anticorpos anti-*Leishmanias* mantém-se por vários anos após a cura clínica do indivíduo, o que complica o diagnóstico de recidiva da doença; *iii*) Pessoas de áreas endémicas de Leishmaniose Visceral e sem histórico da doença, apresentam anticorpos anti-*Leishmanias*, ainda que

geralmente os níveis sejam baixos, promovendo a diminuição da especificidade dos testes; *iv*) Em indivíduos co-infetados com HIV e imunossuprimidos, a sensibilidade dos testes serológicos diminui (Abeijon *et al.*, 2012).

ELISA é um dos ensaios serológicos mais utilizados no diagnóstico de Leishmaniose Visceral. Mesmo sendo uma técnica com boa sensibilidade e especificidade para detectar anticorpos em humanos infetados com a doença, a especificidade depende do antígeno utilizado (Farahmand e Nahrevanian, 2016) e, ainda, existe uma considerável preocupação com reações cruzadas relatadas entre os tripanosomatídeos (Santos *et al.*, 2017).

Ferramentas diagnósticas precisas têm alta relevância na diminuição dos índices de infecção, causando impacto positivo na capacidade dos vários países em suprir a carga das doenças. Para além de promoverem o rastreamento da doença, permitem determinar a eficácia das intervenções, direcionadas ao controle da mesma (Singh e Sundar, 2015). As condições de cultivo dos parasitas e os protocolos para purificação dos antígenos devem ser rigorosamente padronizados pois ao utilizar lotes diferentes de parasitas, os resultados podem variar (Ferreira *et al.*, 2001).

Entre vários procedimentos serológicos existentes, a ELISA é uma das técnicas mais escolhidas para se realizar imunodiagnóstico, por causa de sua capacidade de automação e por permitir processar um grande número de amostras num curto espaço de tempo. Os resultados tendem a ser precisos e as leituras objetivas, além de que, os critérios para validação dos ensaios e a interpretação dos resultados são rigorosos. Uma grande parte das ELISA comercialmente disponíveis para o diagnóstico serológico da doença de Chagas utiliza antígenos obtidos a partir da lise de formas epimastigotas ou tripomastigotas de *T. cruzi*. Apesar de serem sensíveis, por vezes não conseguem fazer distinção entre anticorpos específicos de *T. cruzi* e de *Leishmania* spp., originando resultados falso-positivos que decorre da reatividade cruzada entre estes parasitas.

Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISAs), desenvolvidos por Engvall & Perlmann e Van Weemen & Schurs em 1971, surgiram como alternativa aos radioimunoensaios. Os testes enzimáticos utilizam anticorpos conjugados com enzimas de modo que a atividade imunitária e enzimática de cada porção seja mantida. Esta metodologia é reconhecida por fornecer resultados objetivos e são extremamente sensíveis (Voller *et al.*, 1976).

Anticorpos específicos podem ser estimados quantitativamente por ELISA. O teste baseia-se na solubilização do antígeno por adsorção passiva a uma superfície de poliestireno. Assim, uma placa de poliestireno é revestida com antígeno e após incubação do soro teste, adiciona-se um soro antiglobulina marcado com uma enzima. Havendo ligação entre os anticorpos existentes no soro teste e o segundo anticorpo (soro conjugado com a enzima), a enzima permanece na placa após as lavagens. A adição do substrato da enzima permite obter uma medida quantitativa de um anticorpo específico no soro teste (Voller *et al.*, 1976).

Atualmente existe uma grande diversidade de testes ELISA que juntamente com as diferenças das estirpes isoladas em cada região, a multiplicidade de protocolos utilizados e a prevalência da enfermidade de cada população, resultam numa grande variação entre as ELISA utilizadas na pesquisa de anticorpos IgG contra *T. cruzi*. As diversidades das técnicas ELISA disponíveis para a doença de Chagas são resultantes: *i*) da diversidade de antígenos utilizados (proteínas recombinantes, proteínas de lisados totais do parasita, peptídeos sintéticos, proteínas de fusão contendo epítomos de diferentes proteínas do parasita, frações de proteínas purificadas), *ii*) da expressão das proteínas em algum estágio particular de diferenciação do parasita (amastigota, epimastigota, tripomastigota) ou *iii*) da DTU da estirpe parasitária que originou o antígeno (Llano *et al.*, 2014). A técnica ELISA mede a ação entre antígeno e anticorpo, sem depender de um segundo evento como uma aglutinação, precipitação ou fixação de complemento (Teles *et al.*, 2012).

### **1.3.1. Reatividade serológica cruzada no diagnóstico laboratorial da doença de Chagas e da Leishmaniose Visceral**

Pertencendo à mesma família e, portanto, sendo filogeneticamente próximos, *T. cruzi* e *Leishmania* spp. partilham conjuntos de epítomos antigênicos, com proteínas extremamente conservadas, que podem conduzir à reatividade antigênica cruzada em testes de imunodiagnóstico (Ker *et al.*, 2013; Vega Benedetti *et al.*, 2013).

Antígenos de reação cruzada vêm sendo descritos por provocarem falsas reatividades em ensaios serológicos de triagem para doença de Chagas. Observa-se que alguns destes antígenos ligam-se a anticorpos induzidos por outros parasitas que pertencem ao mesmo grupo de tripanosomatídeos, como *Leishmania*, como também por parasitas

mais distantes como *Plasmodium*. A reação cruzada depende sobretudo da fonte antigénica de *T. cruzi* utilizada no desenvolvimento de imunoensaios (como os extratos brutos de *T. cruzi*, os peptídeos sintéticos ou as proteínas recombinantes) (Saba *et al.*, 2013).

É comum a reação cruzada de antígenos de *Leishmania* com amostras de soros de áreas geográficas onde doenças provocadas por outros protozoários, principalmente a doença de Chagas, se sobrepõem à leishmaniose. É de conhecimento geral que o antígeno total de promastigotas de *Leishmania* reage de forma cruzada com soros positivos para outras doenças, particularmente a doença de Chagas (Celeste *et al.*, 2014). *T. cruzi* e *Leishmania* spp. partilham um acervo antigénico semelhante, apresentando epítomos comuns que podem levar a produção de anticorpos semelhantes pelos pacientes. Por isso, métodos serológicos convencionais podem não diferenciar as infeções por *T. cruzi* e *L. infantum*, principalmente em locais onde doença de Chagas e Leishmaniose Visceral são co-endémicas (Teixeira-Carvalho, A. *et al.*, 2015).

Ao serem utilizados para realizar diagnóstico, uma das funcionalidades mais importantes dos testes serológicos, é sua utilização em áreas endémicas com o intuito de discriminar indivíduos infetados daqueles não infetados ou dos que possam gerar resultados falso-positivos, ou seja, sua capacidade discriminatória. O poder discriminatório de um teste serológico pode variar conforme o antígeno utilizado, a incidência e a prevalência da doença numa área determinada (Llano *et al.*, 2014). Em 1994, a doença de Chagas afetava cerca de 16-20 milhões de pessoas no Continente Americano e a leishmaniose também constituía um sério problema de saúde pública, na mesma região (Malchiodi *et al.*, 1994).

Importante salientar a elevada especificidade das infeções locais, lembrando-se da variabilidade genética e biológica dos isolados de *T. cruzi*, o que pode estar relacionado com a resposta imunitária desenvolvida pelos indivíduos, podendo também influenciar a eficiência dos ensaios de imunodiagnóstico (Santos *et al.*, 2016b). A variação no desempenho dos testes serológicos disponíveis, as dificuldades criadas pelos resultados

inconclusivos e a necessidade de um teste imunológico que ofereça um diagnóstico com resultado sensível e específico, destaca a necessidade de se implementar ensaios imunológicos que minimizem ou solucionem os resultados discrepantes e proporcionem um desempenho ótimo para que possam ser utilizados na definição de perfis serológicos dos indivíduos assim como na prática clínica.

A detecção e o tratamento correto de indivíduos infetados com *T. cruzi* é dificultado pela ausência de métodos precisos no diagnóstico de doença de Chagas além de que dificulta a avaliação da eficácia de iniciativas para o desenvolvimento e implementação de medidas integradas de controle. Ocorrendo o mesmo quanto ao diagnóstico de Leishmaniose Visceral em indivíduos infetados com *L. infantum*.



## **2.Objetivos**



## 2.OBJETIVOS:

A reatividade serológica cruzada entre parasitas protozoários é comum e especificamente entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. é considerada preocupante no imunodiagnóstico da doença de Chagas e Leishmaniose Visceral, sobretudo em áreas de circulação comuns aos dois parasitas. Estes protozoários por pertencerem a mesma família compartilham conjuntos de epítomos antigénicos com proteínas conservadas que podem ser responsáveis pela reatividade serológica cruzada.

Tendo em conta estas considerações, o presente estudo foi delineado:

**O Problema:** A presença de reatividade serológica cruzada entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* durante o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas e Leishmaniose Visceral.

**Pergunta de partida:** Quais os perfis serológicos e antigénicos envolvidos na reatividade serológica cruzada no diagnóstico laboratorial da doença de Chagas e da Leishmaniose Visceral?

**E a Hipótese gerada:** Perfil de anticorpos caracterizados de *Trypanosoma cruzi* e de *Leishmania infantum* estão envolvidos na seroreatividade cruzada no imunodiagnóstico de doença de Chagas e Leishmaniose Visceral?

Para tentar responder à pergunta de partida e validar a hipótese proposta, o presente estudo tem como **Objetivo Geral**, caracterizar a reatividade serológica e antigénica cruzada em amostras de soros de indivíduos diagnosticados com doença de Chagas e Leishmaniose Visceral.

E como **objetivos específicos**:

- i. Caracterizar o perfil de anticorpos IgG totais anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania infantum* em soros de indivíduos diagnosticados com doença de Chagas e Leishmaniose Visceral, respectivamente, utilizando a técnica ELISA.
- ii. Caracterizar o perfil de reatividade serológica cruzada com a pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania infantum* em soros de indivíduos diagnosticados com Leishmaniose Visceral e doença de Chagas, respectivamente, utilizando a técnica ELISA.

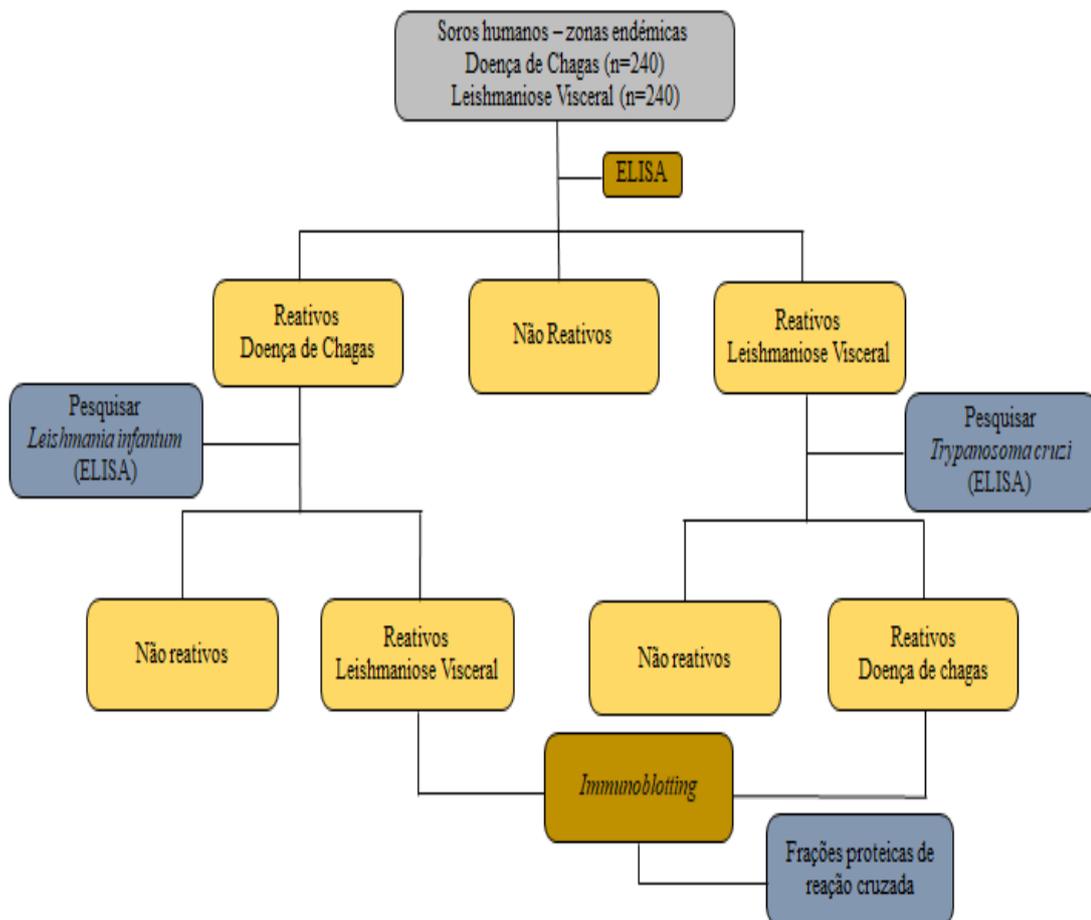
- iii. Caracterizar os antígenos de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* responsáveis pela reatividade serológica cruzada em soros de indivíduos diagnosticados com doença de Chagas e Leishmaniose Visceral, utilizando *immunoblotting*.

# **3. Material e Métodos**



### 3.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental deste estudo foi realizado de acordo com a representação esquemática apresentada na Figura 8. O estudo realizado foi do tipo retrospectivo analítico experimental. A metodologia utilizada incluiu o uso de soros de indivíduos diagnosticados com doença de Chagas ou Leishmaniose Visceral, obtidos no Laboratório Central do Rio Grande do Norte (Natal, Brasil), nos quais foram realizados a pesquisa de antígenos *T. cruzi* e *L. infantum* e anticorpos anti-*T. cruzi* e anti-*L. infantum*. Após dupla seleção foram utilizados para identificação de frações proteicas reconhecidas por anticorpos específicos para *T. cruzi* e *L. infantum*.



**Figura 8. Desenho experimental.** Fluxograma representativo da metodologia utilizada no presente estudo. Soros de indivíduos diagnosticados com doença de Chagas ou Leishmaniose Visceral de áreas endêmicas foram analisados quanto à presença de anticorpos IgG totais reativos para *T. cruzi* e *L. infantum* através de ELISA. As frações proteicas comuns aos dois parasitas foram identificadas por *immunoblotting*.

### **3.2. Amostras de soros de indivíduos diagnosticados com doença de Chagas e Leishmaniose Visceral**

As amostras foram constituídas de soros de indivíduos diagnosticados com a doença de Chagas (n=240) ou Leishmaniose Visceral (n=240), procedentes do Rio Grande do Norte, no nordeste do Brasil. Foram obtidas do Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Norte Dr. Almino Fernandes (LACEN – RN) e mantidas no Laboratório de Imunoparasitologia na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brasil. Além disso, foram obtidos para serem utilizados como controles, 10 soros negativos para doença de Chagas e outros 10 soros negativos para Leishmaniose Visceral. O pedido de autorização para utilização das amostras neste estudo, foi realizado junto à Plataforma Brasil e analisado pelo Comitê de Ética da UFRN-RN, com o número de parecer 5.704.024.

### **3.3. Parasitas e Cultivo Celular**

#### ***Trypanosoma cruzi* estirpe Y**

A estirpe Y de *T. cruzi* foi isolada de um caso humano, em 1953, por Silva e Nussenzweig (1953) e gentilmente cedida pela Dra. Aline Rimoldi, do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Os parasitas encontravam-se criopreservados com 30% de DMSO (dimetilsulfóxido) a -80 °C e após descongelamento, as formas evolutivas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em cultivo axênico contínuo, em meio LIT (*Liver Infusion Triptose*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e 10% de antibiótico Penicilina (10.000 U/mL) e Estreptomicina (10.000 ug/mL).

Formas epimastigotas foram descongeladas em banho-maria a 28°C e, em seguida, centrifugadas a 1800 xg durante 10 min a 4°C para eliminar o DMSO. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi acrescentado 5 mL de meio LIT suplementado com 20% de FBS e 10% de antibiótico, citado anteriormente. Formas epimastigotas cultivadas de forma contínua em meio LIT, suplementado com 10% de

FBS e 10% de antibiótico foram diferenciadas em tripomastigotas pelo processo de envelhecimento de cultivo, onde o estresse nutricional induz ao processo de metaciclo-gênese no parasita (Brener, 2003). O processo ocorreu a partir de uma cultura pré-estabelecida de formas epimastigotas em *T-flask* de 25cm<sup>3</sup>. A partir desta, foi retirado 1 mL de cultivo e transferido para um novo *T-flask*, acrescentando 9 mL de meio LIT, totalizando um volume final de 10 mL. A cultura foi mantida em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 26°C +/- 2° por um mínimo de 25 dias, com observação diária por microscopia. Normalmente, quando o cultivo atinge uma população de tripomastigota superior a 70 % significa que o processo de diferenciação é considerado bem sucedido. Volumes superiores, de meio de cultivo, ao utilizado para o tamanho do *T-flask* podem interferir nos processos de diferenciação, isto se deve a elevada quantidade de meio de cultivo que leva a diminuição de oxigênio e esta diminuição leva à morte do parasita.

As formas tripomastigotas, foram colocadas em *T-flask* com 1 mL de meio LIT, suplementado com 10% de FBS e 10% de antibiótico 10% de antibiótico Penicilina (10.000 U/mL) e Estreptomicina (10.000 ug/mL) e mantidas em estufa BOD a +28 °C. O volume foi duplicado, sempre que após observação no microscópio invertido foi verificava elevada densidade de parasitas. O cultivo foi observado a cada 2-3 dias para verificação da mudança de pH do meio, que foi detetada pela mudança da cor do meio de cultivo, de rosa para amarela.

Lâminas a partir de cultivo axênico de *T. cruzi* foram confeccionadas para observação e verificação de suas formas morfológicas em objetiva de imersão (1000×).

### ***Leishmania infantum***

A estirpe de *L. infantum* foi obtida através de citologia aspirativa com agulha fina em gânglio linfático de um canídeo do canil municipal da região metropolitana de Lisboa e foram mantidos por passagens sucessivas em murganhos BALB/c. As formas promastigotas de *L. infantum* foram mantidas em meio Schneider's *Drosophila* (Sigma-Aldrich, Alemanha) suplementado com 10% de FBS.

As formas promastigotas da espécie *L. infantum* criopreservadas em azoto líquido, nas instalações do IHMT, foram descongeladas à temperatura ambiente e, em seguida,

centrifugadas a 1800 ×g durante 10 min. O objetivo da centrifugação foi separar os parasitas do crioprotetante (DMSO) utilizado na conservação da viabilidade do parasita. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento (*pellet*) ressuspensionado em 1 mL de meio Schneider com 10% FBS. Em seguida, os parasitas foram colocados em frascos de cultivo (*T-flask*) com 1 mL de Schneider e mantidos a 24° C. O volume do meio foi duplicado, sempre, que após observação no microscópio invertido se constatava elevada densidade de parasitas.

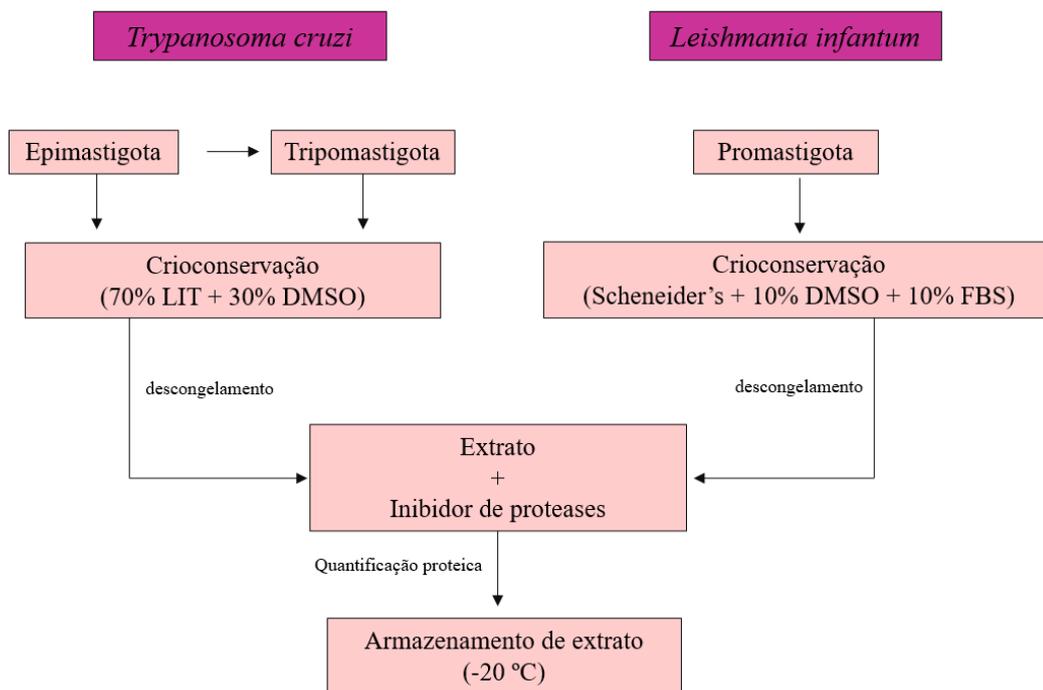
O limite de cinco passagens sugerido por Santos-Gomes e Abranches (1996) foi respeitado para a obtenção de parasitas virulentos.

A partir de cultivo axênico de *L. infantum* foram regularmente confeccionadas lâminas para observação e verificação da forma morfológica em objetiva de imersão (1000×).

### **3.4. Produção de extratos proteicos totais de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum***

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. infantum* foram utilizadas como antígenos para a pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*L. infantum* e anti-*T. cruzi* em teste ELISA. Estirpes de *L. infantum* e *T. cruzi* foram cultivadas em condições axênicas para obtenção de extratos brutos (Figura 9).

Após atingirem a capacidade volumétrica máxima dos *T-flasks* e conferir que estavam na fase estacionária de crescimento, alíquotas de cultivos de *L. infantum* e *T. cruzi*, respectivamente, foram centrifugadas a 3000 ×g a 4°C durante 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* submetidos a três lavagens com tampão fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) através de centrifugação a 3000 ×g a 4°C durante 10 min cada. Ao término das lavagens, os *pellets* foram ressuspensionados em PBS e, em seguida, passaram por um processo de lise mecânica que consistiu em seis ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento de 5 min. O descongelamento ocorreu em vortex à temperatura ambiente (TA). Foi acrescentado inibidor de protease (cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, *EASYpack* - Roche) utilizado para proteger as proteínas da degradação pelas proteases, que são enzimas que quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Foi realizada a quantificação proteica dos extratos e as amostras foram conservadas a -20°C até sua utilização.



**Figura 9. Fluxograma do processo seguido desde o cultivo dos parasitas até o armazenamento dos extratos proteicos.** LIT = Liver Infusion Tryptose, DMSO = dimetilsulfóxido, FBS= Soro fetal bovino.

### 3.4.1. Quantificação proteica dos extratos

Para a quantificação das proteínas dos extratos preparados foi utilizado o Método de Bradford, utilizando placas da marca Brand plates® - pureGrade™. O método de Bradford (Lowry *et al.*, 1951) baseia-se na interação entre o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e macromoléculas de proteínas que apresentam aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Ocorre interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante, ocasionando o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm. Considerado sensível e com grande poder de precisão, deteta proteínas na faixa entre 20-2000 µg/mL. Foi feita uma curva de calibração de acordo com o seguinte procedimento: preparou-se uma solução-mãe (Solução Stock) na concentração de 10.000 µg/mL (10 mg/mL) de BSA (Albumina

Bovina Sérica) (0,01 g de BSA em 1 mL de PBS). A partir da solução-mãe foram efetuadas diluições em PBS 1× (Tabela 2).

Após preparação das diluições do BSA em PBS, em tubos de ensaio, foram colocados em placas de poliestireno, 5 µL de cada diluição e adicionado 250 µL de reagente de Bradford a cada poço (volume final = 255 µL). O branco da reação foi constituído por 255 µL de PBS. Foi colocado 5 µL de cada amostra de extrato parasitário nos poços e acrescentado 250 µL de reagente de Bradford (volume final = 255 µL). A curva foi realizada em triplicata e as amostras em duplicata. Em seguida, a placa foi incubada durante 20 min a TA, ao abrigo da luz. No final da incubação, foi efetuada a leitura das densidades óticas em leitor de microplacas (BioTeK Epoch, Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek com comprimento de onda de 570 nm. A equação da reta foi determinada e a quantificação proteica, dos extratos parasitários, estimada.

**Tabela 2. Diluições de BSA utilizadas na curva de calibração para quantificação de proteínas pelo Método de Bradford.**

Identificação do tubo	Concentração final	Diluição	PBS (1×)	Volume final
A	2000 µg/µL	20 µL (da Sol. mãe = 10.0000 µg/µL)	80 µL	100 µL
B	1500 µg/µL	15 µL (da Sol. mãe = 10.0000 µg/µL)	85 µL	100 µL
C	1000 µg/µL	50 µL (da Sol. mãe = 2.000 µg/µL) – Tubo A	50 µL	100 µL
D	750 µg/µL	50 µL (da Sol. mãe = 1.500 µg/µL) – Tubo B	50 µL	100 µL
E	500 µg/µL	50 µL (da Sol. mãe = 1.000 µg/µL) – Tubo C	50 µL	100 µL
F	250 µg/µL	50 µL (da Sol. mãe = 500 µg/µL) – Tubo E	50 µL	100 µL
G	125 µg/µL	50 µL (da Sol. mãe = 250 µg/µL) – Tubo F	50 µL	100 µL
H	0 µg/µL	----	100 µL	100 µL

### 3.4.2. Perfil Eletroforético dos Extratos Proteicos por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).

Os extratos foram submetidos a Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) para verificação das frações proteicas por massa molecular. Sendo um molde inerte através do qual as proteínas podem migrar, o gel de poliacrilamida com SDS é preparado pela polimerização de monômeros de acrilamida na concentração em que o tamanho dos poros permite a migração das proteínas. O SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), quebra as ligações não covalentes das proteínas o que faz com que elas retornem à sua estrutura primária, mantendo-as separadas e lineares. Para além disso é um detergente carregado negativamente que na presença de um campo elétrico facilita a migração das proteínas do pólo negativo em direção ao pólo positivo. A adição do Temed (*N, N, N', N'*-tetrametiletilenodiamina) e persulfato de amônia (APS) são essenciais para a polimerização do gel. O Temed, um estabilizador de radicais livres, cataliza a liberação de radicais livres a partir de APS, acelerando o processo de polimerização do gel.

O sistema para a preparação do gel, que inclui um suporte que prende e une um espaçador de 1.5 mm a uma placa de vidro, foi montado. O gel de corrida (Tabela 3), na concentração de 10% foi vertido no suporte entre o espaçador e a placa de vidro e deixado a polimerizar. Com o intuito de evitar a formação de bolhas, foi adicionado, com uma pipeta, isopropanol no topo do gel até atingir a altura de cerca de 0,5 cm. Após a polimerização do gel de corrida, o isopropanol foi eliminado e preparado o gel de empilhamento (Tabela 3) que foi colocado por cima do gel de corrida. De imediato, o pente (escolhido de acordo com o tamanho do espaçador) foi introduzido no gel de empilhamento, deixando o gel polimerizar.

Após a polimerização completa do gel (gel de corrida + gel de empilhamento), as placas de vidro contendo o gel polimerizado foram colocadas num suporte com a face da placa menor voltada para o interior do mesmo. A cassette montada no interior do rack foi transferida para uma cuba de eletroforese. O pente foi gentilmente retirado, a formação dos poços foi confirmada visualmente e o tampão de corrida (250 mM Tris, 1.92 M glicina, 1% SDS) adicionado. A seguir, foram aplicados em vários volumes (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35  $\mu$ L), respectivamente, os extratos proteicos por poços e 5 $\mu$ L de

marcador (Hyper PAGE Prestained Protein Marker, Bioline, UK) nos poços formados. A cuba de eletroforese foi ligada a fonte e a corrida foi iniciada com 80V. Quando as amostras atingiram o gel de corrida, a voltagem foi aumentada para 120V. Ao final da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado.

**Tabela 3. Constituição dos géis de poliacrilamida.**

Reagentes	Gel de Corrida - 10% Acrilamida (mL)	Gel de Empilhamento (mL)
H2O desionizada	4,1	2,5
Solução de Acrilamida (30% Acrilamida + 0,8% Bis-Acrilamida)	3,3	0,45
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	2,5	---
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	---	0,333
SDS 10%	0,1	0,33
Persulfato de Amónia 30%	0,05	0,166
TEMED	0,005	0,0047

Para visualização das proteínas diretamente no SDS-PAGE foi realizada coloração direta do gel com Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant blue G250 Merck) cujo limite de detecção, pelo método padrão, é de 300 a 1000 ng. O gel foi mergulhado no corante por 2H e, quando retirado, foi colocado em solução descorante até a completa visualização das bandas proteicas. A solução descorante tem a função de remover o corante que não se ligou ao gel, deixando as bandas de proteínas, visíveis, coradas em azul em um gel transparente.

### **3.5. Otimização de um imunoenensaio ELISA para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania infantum***

Para a pesquisa de anticorpos IgG totais em soros de indivíduos diagnosticados com doença de Chagas ou Leishmaniose Visceral foi desenvolvido, no presente estudo, dois

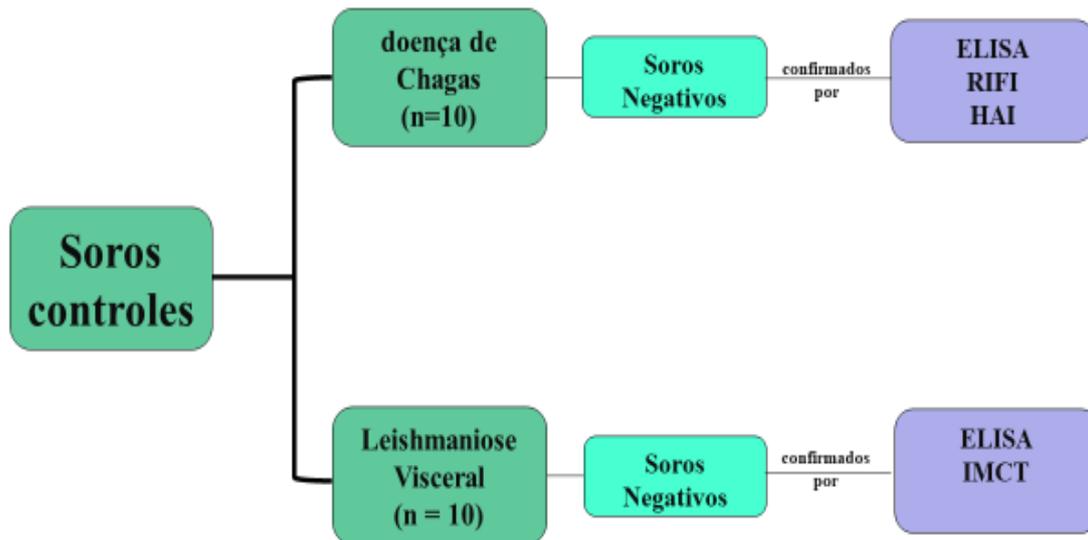
testes de ELISA *in house*: (i) *Tc*-ELISA para detecção de anticorpos IgG totais anti-*T. cruzi* e (ii) *Li*-ELISA para detecção de anticorpos IgG totais anti-*L. infantum*.

A determinação da concentração de proteínas que permitiu determinar a quantidade de antígeno a ser colocada para adsorção da placa de poliestireno foi realizada a partir de SDS-PAGE de extratos brutos de tripomastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. infantum*, respectivamente e, depois, corados com azul de Comassie. Foram colocadas várias quantidades (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 µL) de extratos por poço e, a partir do valor da concentração proteica do extrato, foram calculadas as concentrações para cada volume de extrato. A SDS-PAGE permitiu a visualização das bandas proteicas dos extratos em vários volumes (µL) e com os valores das concentrações calculados para cada volume, foi escolhida a concentração para ser utilizada em ELISA, a que demonstrou uma visualização ótima das bandas proteicas dos extratos.

O anticorpo primário (soros dos pacientes) foi testado, preliminarmente, em diluição seriada (1:100, 1:200, 1:400, 1:800) para que fosse encontrada a diluição a partir da qual fosse verificada discriminação entre soros positivos e soros negativos. A diluição 1:200 foi a escolhida por apresentar resultados que permitiam discriminar com distinção, amostras reativas de amostras não reativas.

O anticorpo secundário foi utilizado na diluição indicada pelo fabricante (Anti-Human IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody, Sigma).

Foram utilizadas como amostras controles, soros reconhecidamente negativos para a doença de Chagas e Leishmaniose Visceral. Os soros negativos para doença de Chagas foram caracterizados, pelo Laboratório Central do Rio Grande do Norte (Natal, Brasil), por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação de Hemaglutinação (HAI) e os negativos para Leishmaniose Visceral, por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e imunocromatografia (IMCT) (Figura 10).



**Figura 10. Soros controles utilizados.** Ensaios prévios utilizados para caracterização de negatividade das amostras para doença de Chagas (n =10) e Leishmaniose Visceral (n = 10): ELISA = Ensaio de Imunoadsorção Enzimática, RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta, HAI = Reação de Hemaglutinação, IMCT = Imunocromatografia.

### 3.5.1. Determinação de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania infantum* por ELISA em soros de indivíduos diagnosticados com doença de Chagas e Leishmaniose Visceral

Placas de poliestireno com 96 poços (Nunc™, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas com tampão bicarbonato (pH 8.5). A carga negativa da solução negativa promove a adsorção do antígeno à placa de forma passiva através de interações eletrostáticas com as cargas positivas do poliestireno.

Os extratos proteicos de tripomastigota de *T. cruzi*, estirpe Y, e promastigota de *L. infantum* foram diluídos em tampão bicarbonato 0.1 M pH 8.5 e adsorvidos às placas, numa concentração de 100 ng/poço. Foi colocado 100 µl/poço do extrato diluído em tampão. A placa foi colocada em câmara húmida e incubada *overnight* a 4°C. Foram efetuadas três lavagens (200 µl/poço) com tampão de lavagem [PBS (1X) + Tween 20 0,05% (v/v)]. As lavagens, que têm como objetivo eliminar o excesso

de imunoreagentes e preparar a placa para a etapa seguinte, foram realizadas de forma manual. Durante as lavagens, as placas foram esvaziadas e todos os poços foram preenchidos com o tampão de lavagem. Em seguida, as placas foram agitadas suavemente durante 1 min e invertidas num recipiente, seguida de repetidas batidas numa superfície sólida revestida com papel absorvente, até que a olho nú fosse verificada a ausência de tampão de lavagem.

As placas foram bloqueadas com 200 µl/poço de tampão de bloqueio [PBS contendo leite 1% (m/v)], durante uma hora a TA, sob agitação. O bloqueio consiste na cobertura, por proteínas, dos espaços deixados vazios pelos antigénios após sua adsorção. Tem o objetivo de evitar ligações inespecíficas e reações errôneas, evitando falsas interpretações, como resultados falso-positivos ou falso-negativos. Neste caso, utilizou-se leite desnatado como uma fonte de proteína inerte (caseína), que evita a adsorção inespecífica dos anticorpos à placa.

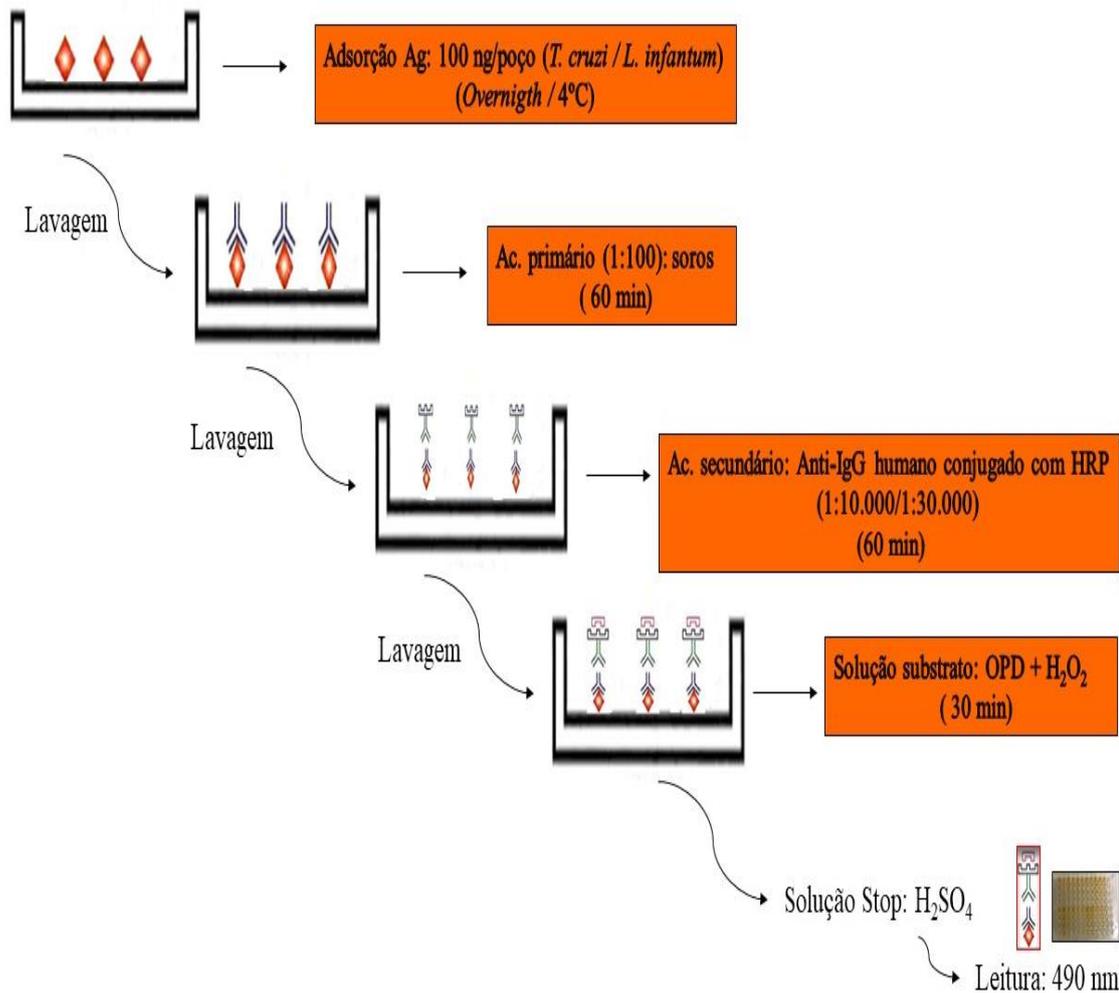
Foram feitas cinco lavagens com tampão de lavagem (200 µl/poço) para retirada da caseína e, em seguida, acrescentou-se 100 µl/poço do anticorpo primário diluído (1:200) em tampão anticorpo (PBS (1x) + Tween 20 0,05% + leite 0,5%). As placas foram incubadas em agitação durante uma hora a TA e novamente lavadas (5 x) com tampão de lavagem (200 µl/poço) para eliminar eventuais excessos de anticorpo primário.

O anticorpo secundário conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP) [*Anti-Human IgG (whole molecule) – peroxidase antibody produced in goat* (Sigma)] (100 µl) foi adicionado a cada poço. O conjugado foi diluído a 1:30.000 em tampão anticorpo (v/v). As placas foram incubadas em agitação durante uma hora a TA. Após a incubação, foram realizadas cinco lavagens com tampão de lavagem (200 µl/poço) para eliminar o excesso de conjugado.

A seguir foi adicionado 100 µl/poço de solução de substrato (reveladora) de acordo com a enzima utilizada (HRP) no conjugado. A solução de substrato consistiu em uma pastilha de 10 mg dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) dissolvida em 10 mL de tampão citrato 0,1 M pH 5 e 10 µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich). Essa solução reveladora é constituída por um tampão (tampão citrato), um substrato (peróxido de hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) correspondente à enzima utilizada (peroxidase) e ainda, por um componente doador de elétrons, um cromógeno (OPD -

dicloridrato de o-fenilenodiamina). A peroxidase reduz o  $H_2O_2$  com liberação de oxigénio que oxida o OPD, causando a alteração da cor do sistema. As placas foram incubadas durante 30 min a TA e ao abrigo da luz.

Ao final da incubação, a reação enzima-substrato foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L/poço da solução STOP ( $H_2SO_4$  4N) e procedeu-se, de imediato, a leitura das absorbâncias em leitor de microplacas com comprimento de onda de 490 nm (Figura 11).



**Figura 11. Detecção de anticorpos IgG totais, anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania infantum* por ELISA in house.** Adsorção das placas com os antígenos *T. cruzi* e *L. infantum*. Anticorpos (Acs) primários: soros de doença de Chagas e de Leishmaniose Visceral em diluição 1:200. Anticorpo (Ac) secundário: anti-IgG humano conjugado com peroxidase de rábano (HRP). Solução de substrato: pastilha OPD com peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Solução Stop: ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 4N. Leitura das densidades óticas: 490 nm.

### **3.6. Identificação de Antígenos envolvidos na reatividade serológica cruzada no diagnóstico da doença de Chagas e Leishmaniose Visceral por *Immunoblotting***

Os soros analisados por *immunoblotting* (Figura 12) foram selecionados a partir dos resultados obtidos da caracterização serológica quanto à presença de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e anticorpos anti-*Leishmania infantum* através dos ensaios de ELISA.

Os extratos de *T. cruzi* e *L. infantum* obtidos por gel de poliacrilamida foram submetidos a SDS-PAGE para separação das frações proteicas. Os extratos selecionados foram diluídos (1:2) em tampão de amostra (1% azul de bromofenol, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 25% glicerol e 10% SDS) com  $\beta$ -mercaptoetanol e aquecidas a 95 °C durante 5 min para a desnaturação das proteínas. O  $\beta$ -mercaptoetanol quebra as ligações dissulfeto (S-S) dos resíduos de cisteína que estabelecem a ligação das proteínas a outras moléculas.

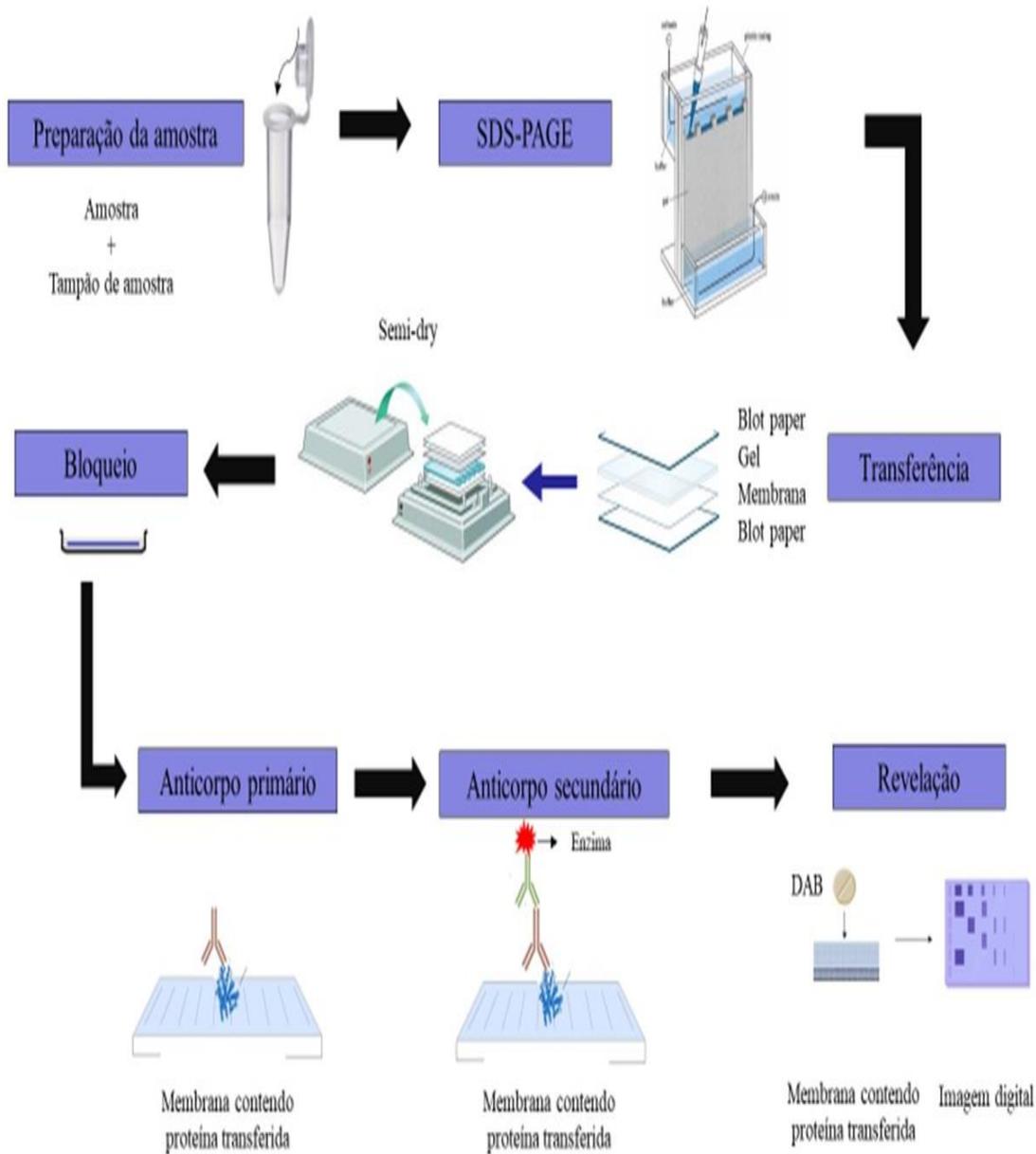
O sistema para a preparação do gel foi montado e os géis (corrida e empilhamento) preparados (Tabela 3). O gel de corrida a 10% foi vertido no suporte entre o espaçador e a placa de vidro e deixado a polimerizar. Adicionou-se, isopropanol no topo do gel até atingir a altura de cerca de 0.5 cm, para evitar a formação de bolhas. Após polimerização do gel de corrida, o isopropanol foi eliminado e preparado o gel de empilhamento que foi colocado acima do gel de corrida. Imediatamente, o pente (escolhido de acordo com o tamanho do espaçador) foi introduzido no gel de empilhamento, ficando o gel a polimerizar. Após a polimerização completa do gel (gel de corrida + gel de empilhamento), as placas de vidro contendo o gel polimerizado foram colocadas num suporte com a face da placa menor voltada para o interior do mesmo. A cassete montada no interior do rack foi transferida para uma cuba de eletroforese. O pente foi calmamente retirado, a formação dos poços foi confirmada visualmente e o tampão de corrida (250 mM Tris, 1.92 M glicina, 1% SDS) adicionado. Em seguida, foram aplicados os extratos, respectivamente, em poço único e 5 $\mu$ L de marcador nos poços. A cuba de eletroforese foi ligada a fonte e a corrida foi iniciada com 80V. Quando as amostras atingiram o gel de corrida, a voltagem foi aumentada

para 120V. Ao final da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado e mergulhado em tampão de transferência (192 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol), durante 15 min para remoção do excesso de SDS. Foram utilizadas membranas de nitrocelulose (Amersham <sup>TM</sup> Protran <sup>TM</sup>. Premiun 0.45 µm NC – Nitrocellulose Blotting Membrane) por serem eficientes na ligação a proteínas. A membrana e os filtros de transferência (Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad) com 8.5 cm por 6 cm foram imersos em tampão de transferência durante 15 min para estabilização. No Semi-dry (Bio-Rad) foi montado o sanduiche na seguinte ordem: *blot paper* – gel – membrana – *blot paper*. A corrida foi realizada a 20 V durante 45 min. No final, para manter a integridade química, a membrana foi retirada e imersa em PBS 1X, a 4°C *overnight*.

No dia seguinte, a membrana foi cortada em tiras de 5 mm e lavadas duas vezes com tampão de lavagem e uma vez com PBS (1x), em agitação durante 10 min a TA, cada uma. Para efetuar o bloqueio, as tiras foram imersas em leite desnatado 1% em PBS (1X) durante 1H em agitação a TA. Devido ao fato da membrana utilizada apresentar uma alta afinidade para proteínas, é essencial efetuar o bloqueio das tiras no intuito de evitar que os anticorpos se liguem inespecificamente à superfície da membrana. O leite desnatado é eficiente no bloqueio de ligações proteicas, assegurando a ligação específica do soro ao antigénio. Após repetir o esquema de lavagem anterior (duas lavagens com tampão de lavagem e uma lavagem com PBS) as tiras foram imersas em anticorpo primário diluído 1: 100 (990 µL de tampão anticorpo e 10 µL de soro) em agitação, durante uma hora à TA. As tiras foram novamente lavadas e, em seguida, imersas em anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com peroxidase diluído em tampão anticorpo 1:10.000 (V/V). Após incubação em agitação durante 1H a TA, as tiras foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem.

A revelação foi realizada por método imunoenzimático, utilizando um substrato cromogénico que precipita quando oxidado. Foi utilizado um conjunto de dois tablets (SIGMAFAST<sup>TM</sup> 3,3'-Diaminobenzidine, Sigma-Aldrich Co.), onde um é constituído por 3,3'-diaminobenzidine (DAB) e um outro, por ureia de peróxido de hidrogénio. Ambos foram dissolvidos em 5 mL de água deionizada. As tiras foram imersas na solução de revelação, em agitação, a TA até o desenvolvimento de cor (~ 15 min). A DAB oxidada pelo peróxido de hidrogénio em reação catalizada pela HRP, origina um precipitado

castanho, insolúvel em água. A reação foi terminada com água e foi tirada fotografia do resultado final.



**Figura 12. Representação esquemática de *immunoblotting* para detecção de frações proteicas reativas aos anticorpos de soros de doença de Chagas:** *i*) Preparação da amostra (soros + tampão de amostra); *ii*) SDS-PAGE, separação das frações proteicas; *iii*) Transferência das proteínas, do gel para uma membrana de nitrocelulose; *iv*) Bloqueio da membrana e aplicação dos anticorpos primários (soros de indivíduos com doença de Chagas e Leishmaniose Visceral) e secundários (conjugados); *v*) Revelação por um substrato cromogénico (pastilhas DAB); *vi*) Registro dos resultados por aquisição de imagens digitais.

### **3.7. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Prism 8.0 for Windows (GraphPad Software, Inc.). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade das amostras. O teste, não paramétrico, Kruskal-Wallis foi utilizado para analisar a associação entre as variáveis. Média e desvio-padrão foram calculados e utilizados para comparação entre os grupos de resultados. Foram elaboradas Curvas Receiver Operating Characteristic (ROC) para verificação da sensibilidade e especificidade dos testes ELISA, as quais foram calculadas em função do valor do corte, considerando intervalo de confiança de 95% para a área sob a curva.

## **4. Resultados**



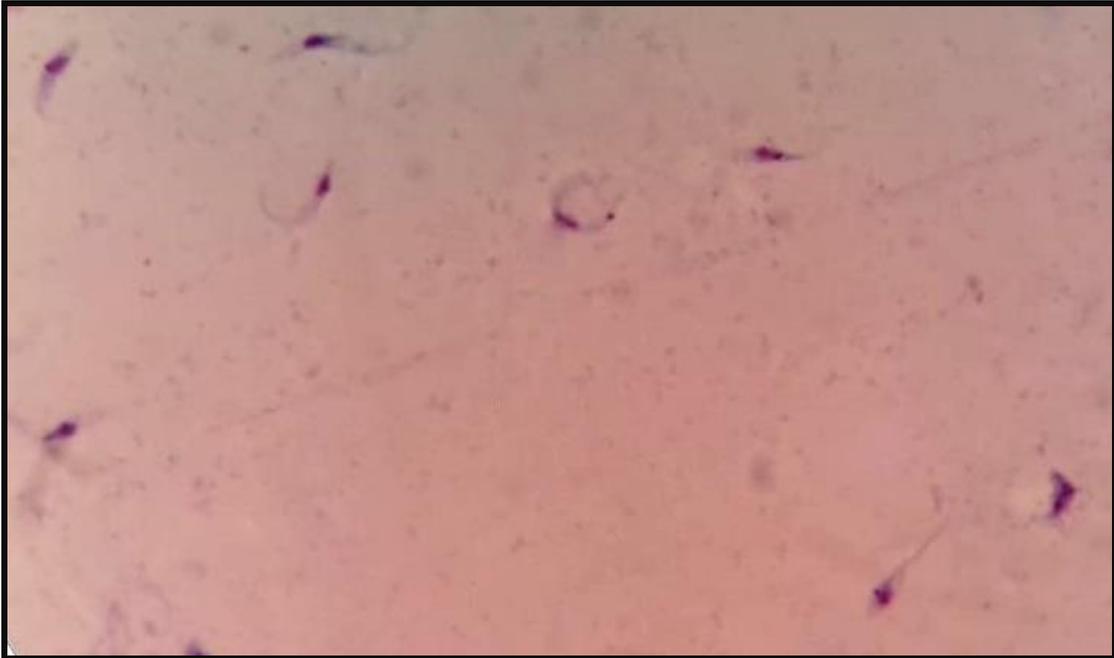
## 4.RESULTADOS

Por serem da mesma família, os tripanosomatídeos *T. cruzi* e *L. infantum* compartilham um conjunto de determinantes antigénicos responsáveis por reações serológicas cruzadas durante o imunodiagnóstico da doença de Chagas e da Leishmaniose Visceral. Essas reações cruzadas provocam alterações na precisão diagnóstica, podendo gerar distorções em inquéritos serológicos e estudos epidemiológicos. Além de que, a sobreposição da distribuição geográfica das duas patologias e as características endémicas similares favorecem o surgimento de tais reatividades. Neste estudo experimental, 240 soros de indivíduos com doença de Chagas e 240 soros de indivíduos com Leishmaniose Visceral foram analisados por ELISA para deteção de anticorpos IgG totais anti-*T. cruzi* e anti-*L. infantum*, respectivamente. Também pesquisou-se a reatividade antigénica cruzada pela ELISA, utilizando extratos de *L. infantum* para detetar anticorpos IgG totais em soros de doença de Chagas e extratos de *T. cruzi* para detetar anticorpos IgG totais em soros de Leishmaniose Visceral. Em seguida utilizou-se *immunoblotting* para identificar frações proteicas de *T. cruzi* reconhecidas por soros de Leishmaniose Visceral e frações proteicas de *L. infantum* reconhecidas por soros de doença de Chagas.

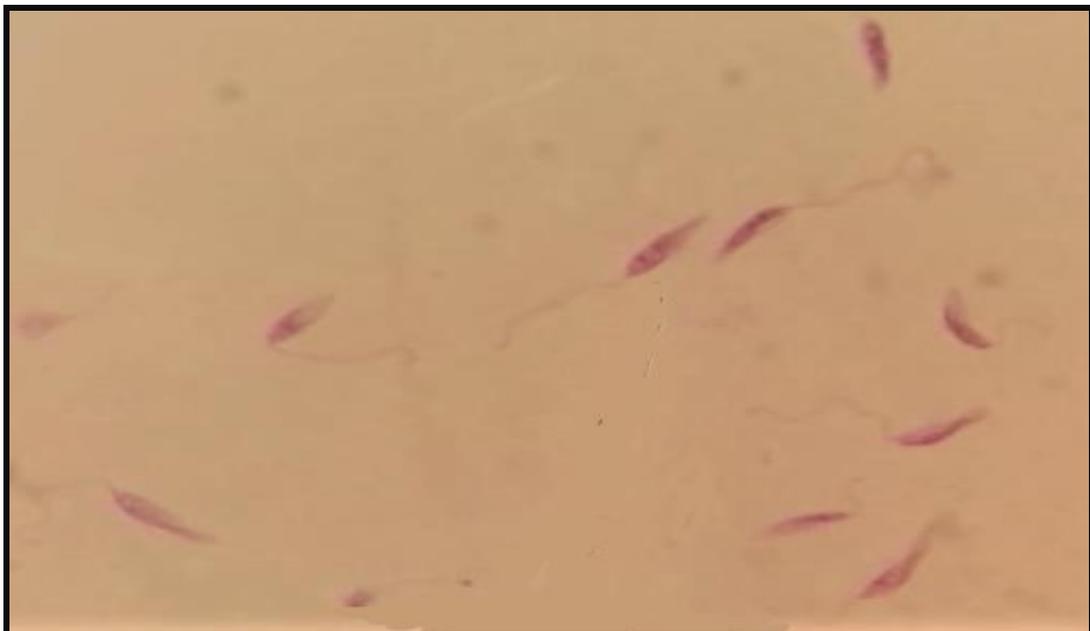
### 4.1. Cultivo dos parasitas e caracterização dos extratos proteicos de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* para otimização de ELISA

As formas evolutivas tripomastigotas e promastigotas dos parasitas utilizados neste estudo – *T. cruzi* e *L. infantum* – foram cultivadas em condições axénicas e ao atingirem a fase estacionária, preparou-se o extrato total das estirpes e realizou-se quantificação das proteínas. Em seguida, procedeu-se à confirmação da presença de proteínas nos extratos pela análise do perfil eletroforético por SDS-PAGE e corado por comassie-blue.

Para certificação da presença dos parasitas em manutenção, lâminas de cultivo axénico foram confeccionadas para observação e verificação das formas morfológicas, tripomastigota de *T. cruzi* (Figura 13) e promastigota de *L. infantum* (Figura 14) e visualizadas em objetiva de imersão (100X).



**Figura 13. Tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.** Esfregaço de cultivo axénico corado pelo método de Giemsa (microscopia ótica, ampliação 100 x).



**Figura 14. Promastigota de *Leishmania infantum*.** Esfregaço de cultivo axénico, corado pelo método de Giemsa (microscopia ótica, ampliação 1000x).

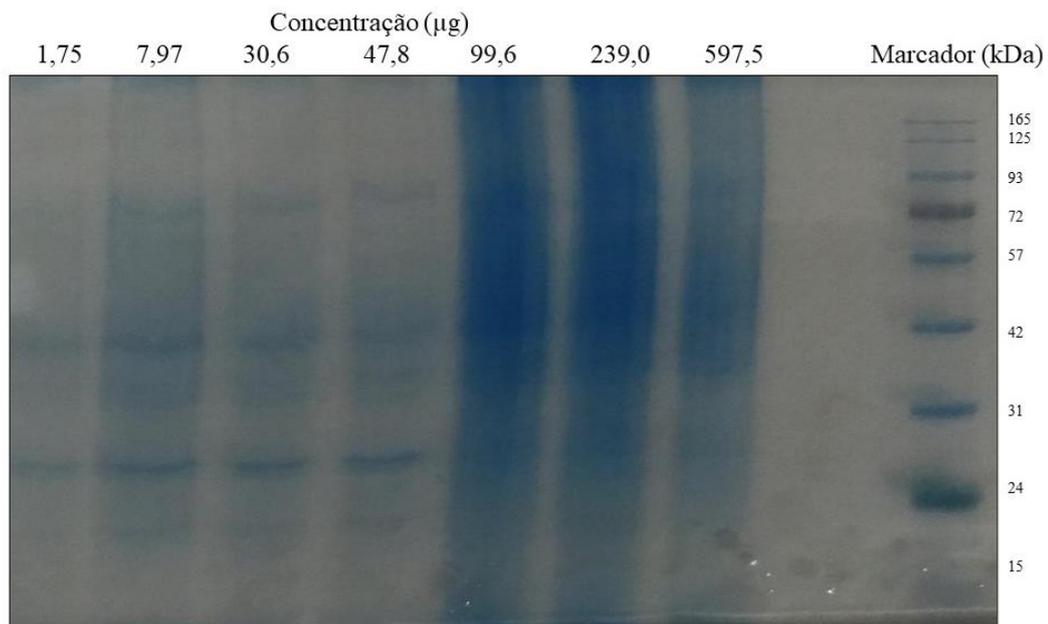
Na fase estacionária do cultivo os parasitas *T. cruzi* e *L. infantum* foram centrifugados e lavados três vezes com tampão fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) por centrifugação. Em seguida, realizou-se lise mecânica dos parasitas e, subsequentemente, a quantificação das proteínas, utilizando curva padrão de proteína Albumina Sérica Bovina (*Bovine Serum Albumin- BSA*).

Em seguida, realizou-se a caracterização dos extratos proteicos de *T. cruzi* e de *L. infantum* utilizando SDS-PAGE e corados por Comassie-blue, como pode ser observado na Figura 16. No SDS-PAGE foram aplicados extratos em vários volumes e calculou-se as respectivas concentrações. Assim, constatou-se e demonstrou-se a existência de proteínas nos extratos. A partir disso, determinou-se a quantidade de antígeno a ser colocado para adsorção da placa de poliestireno para execução do ELISA.

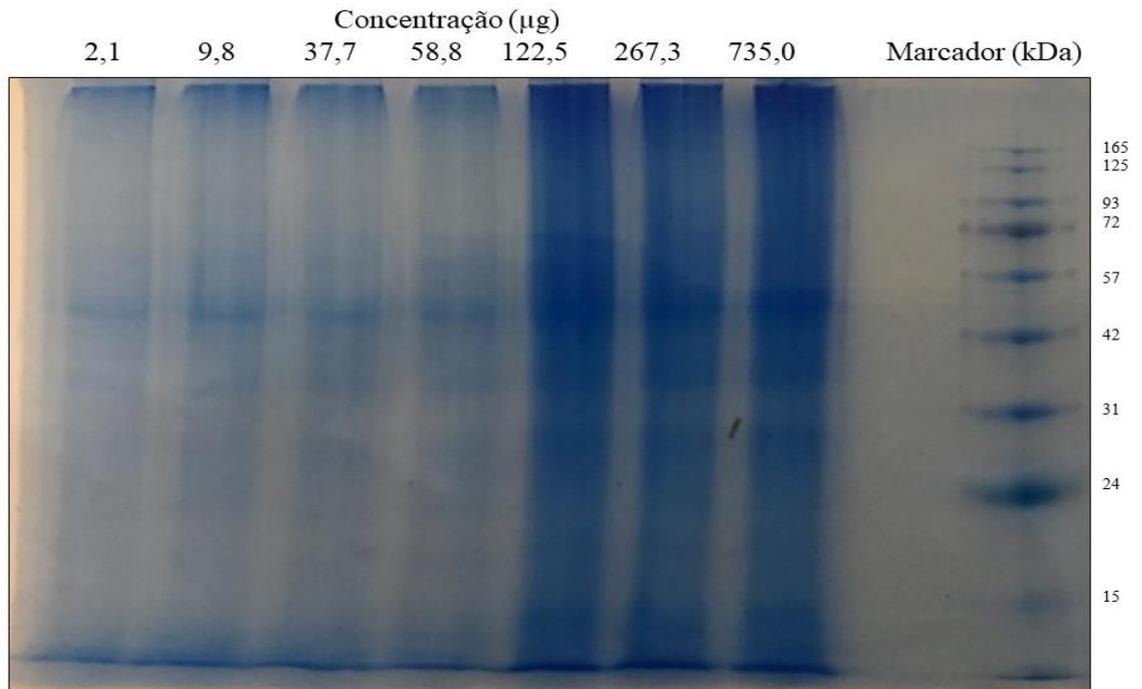
Verificou-se no extrato de *Trypanosoma cruzi* (Figura 15a) a presença de proteínas com massas moleculares entre 24 e 93 kDa, No extrato de *Leishmania infantum* (Figura 15b) verificou-se a presença de proteínas com massas moleculares entre 24 e 57 kDa.

Com os valores das concentrações de proteínas dos extratos calculados para cada volume, foi escolhida uma concentração para ser utilizada em ELISA que demonstrou no SDS-PAGE uma visualização ótima das bandas proteicas dos extratos.

(a)



(b)



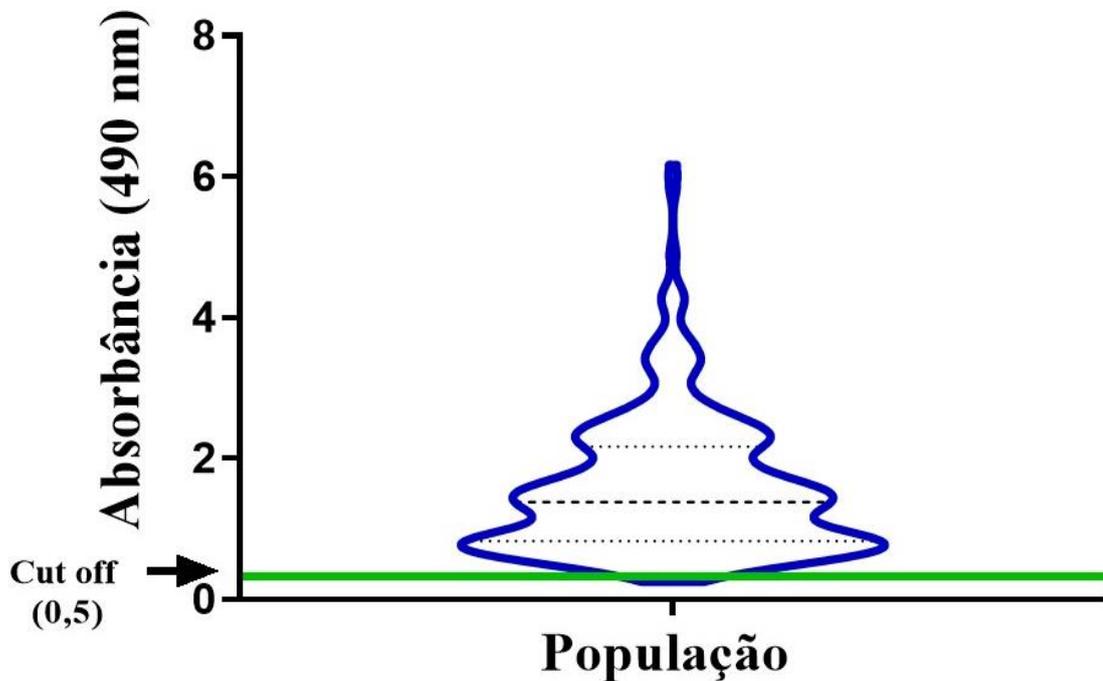
**Figura 15. Perfil eletroforético de extratos de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*.** Extratos proteicos de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* foram caracterizados por eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE). **(15a)** Extrato proteico de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (2,39 µg/µL) em diferentes volumes. Coloração por Comassie blue. **(15b)** Extrato proteico de promastigotas de *Leishmania infantum* (2,94 µg/µL) em diferentes volumes. Coloração por Comassie blue.

#### 4.2. Determinação de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em indivíduos com doença de Chagas

Para a determinação do perfil de anticorpos IgG totais e anti-*T. cruzi* em soros de indivíduos com doença de Chagas, procedentes de áreas endêmicas do Nordeste do Brasil, realizou-se diluição seriada (1:100, 1:200, 1:400, 1:800) das amostras em ELISA. Para quantificação do anticorpo utilizou-se o resultado do rateio entre o valor da Densidade Ótica (DO) da diluição 1:200 dos soros analisados sobre o valor do *Cut off*. O *cut off* foi calculado a partir da média de todas as leituras negativas com 2 Desvios-padrão (+/- 2DP). Ou seja,  $Cut\ off = Média\ das\ DOs\ negativas + (+/-)\ 2DP$ . Assim:  $Anticorpos = DO\ soro\ (1:200) / Cut\ off$ .

Avaliou-se por ELISA a atividade antigênica do extrato *T. cruzi*, com a pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*T. cruzi* em 240 soros de indivíduos com doença de Chagas

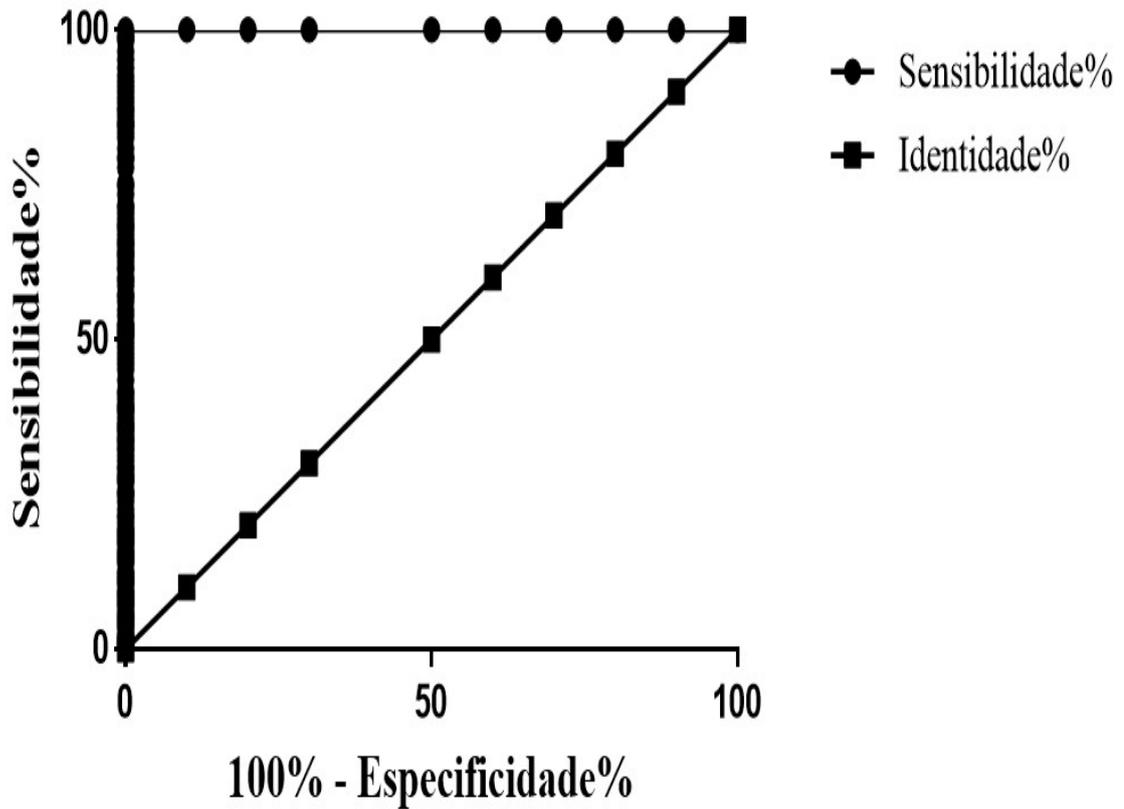
Figura 16). Destes, 95,8% (230/240) foram serologicamente positivos para anticorpos IgG totais contra *T. cruzi* e 4,2% (10/240) foram serologicamente negativos.



**Figura 16. Reatividade serológica anti-*Trypanosoma cruzi* (Tc-ELISA) de indivíduos com doença de Chagas de área endêmica brasileira.** Tc-ELISA foi utilizado na pesquisa de IgG total anti-*T. cruzi* em soros humanos de doença de Chagas (n=240). O nível de reatividade dos soros está representado em *box & violin*, indicando a média e o desvio padrão. As linhas pontilhadas azuis representam a média e medianas. A linha verde representa o *cut off*.

O resultado da curva ROC (Figura 17) validou o Tc-Elisa utilizado na pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*T. cruzi* em soros de indivíduos com doença de Chagas (n = 240), procedentes de áreas endêmicas do Nordeste do Brasil. Ao verificar a capacidade discriminatória entre amostras reativas e não reativas, a curva resultou numa área 100%, com erro padrão 0.0, o melhor ponto de corte foi determinado com sensibilidade de 99,1% (IC 95% = 96,89% a 99,89%) e especificidade de 100% (IC 95% = 69,15 % a 100,0%) e p valor < 0,0001.

*Tc*-ELISA apresentou bom desempenho no diagnóstico de amostras de indivíduos com doença de Chagas. A área abaixo da curva foi de 100%, indicando que *Tc*-ELISA apresentou boa capacidade na discriminação entre soros reativos e não reativos.

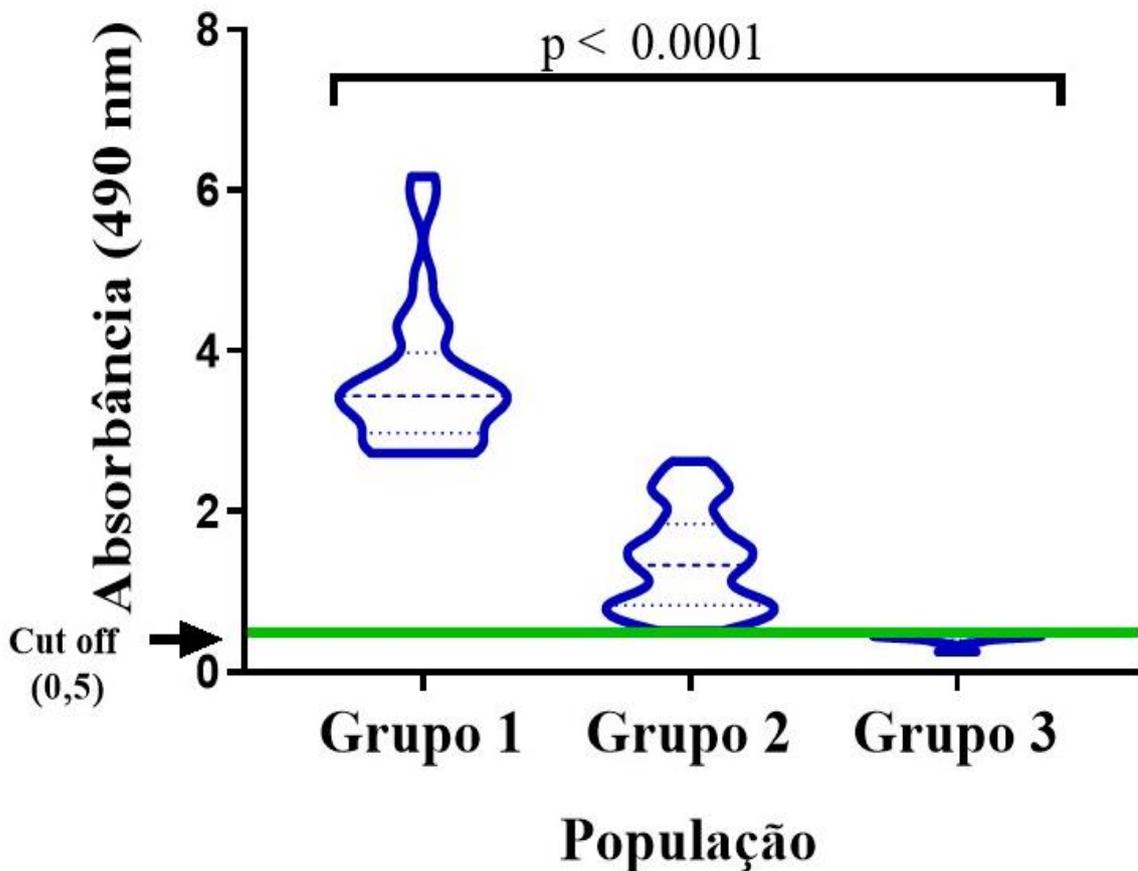


**Figura 17. Representação de curva ROC para teste *Tc*-ELISA na pesquisa de anticorpos IgG totais em soros de indivíduos com doença de Chagas de área endêmica brasileira.** A área sob a curva foi determinada com intervalo de confiança de 95%. O ponto de corte foi determinado com sensibilidade de 99,1% e especificidade de 100% e *p* valor < 0.0001.

Ao utilizar *Tc*-ELISA em soros de indivíduos com doença de Chagas, configurou-se em *box & whiskers* (Figura 18) a presença de três grupos de reatividade serológica. O Grupo 1 (*n* = 25), apresentou valores de reatividades serológicas com densidades óticas compreendidas entre 2.72 e 6.17; o Grupo 2 (*n* = 205), entre 0.51 e 2.63 e o Grupo 3 (*n* = 10) entre 0.25 e 0.50.

Dentre os grupos de reatividades serológicas formados, a maior parte da amostra analisada encontra-se no Grupo 2, cujas reatividades serológicas apresentaram densidades óticas intermédias (0.51 e 2.63) entre os Grupos 1 e 3.

Analisando estatisticamente, foi verificada a normalidade das amostras pelo uso do teste de Kolmogorov-Smirnov. Encontrando ausência de normalidade, utilizou-se o teste, não paramétrico, Kruskal-Wallis para comparação estatística entre as amostras de cada país. Usando intervalo de confiança de 95%, ou seja,  $p < 0.05$ , verificou-se diferenças extremamente significativas entre os grupos de amostras com a obtenção de  $p < 0.0001$ .

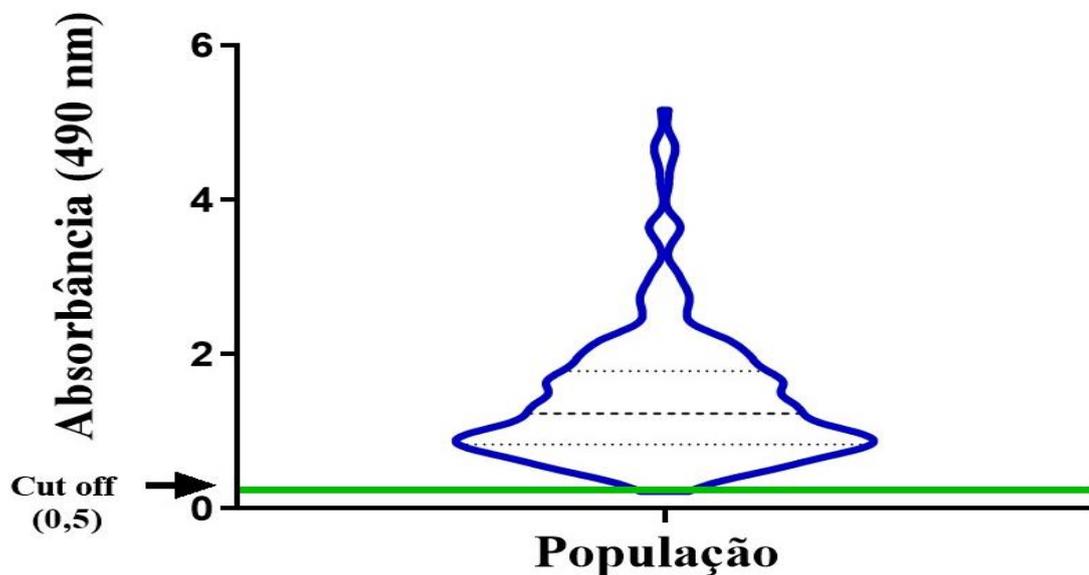


**Figura 18. Grupos de reatividade serológica anti-*Trypanosoma cruzi* (Tc-ELISA) de indivíduos com doença de Chagas de área endêmica brasileira.** Foram constituídos três grupos de soros tendo em conta o nível de reatividade serológica pelas densidades óticas: Grupo 1 ( $n = 25$ ), Grupo 2 ( $n = 205$ ) e Grupo 3 ( $n = 10$ ). Os resultados encontram-se representados em *box & violin*, indicando a média e o desvio padrão. As linhas pontilhadas azuis representam a média e medianas, em cada grupo. A linha verde representa o *cut off*. O teste de Kruskal-Wallis, foi utilizado na comparação estatística dos resultados, usando um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0.05$ ).  $P < 0.0001$  indica diferença extremamente significativa.

### 4.3. Determinação de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em indivíduos com Leishmaniose Visceral

Para a determinação do perfil de anticorpos IgG totais em soros de indivíduos com Leishmaniose Visceral (n = 240), procedentes de áreas endêmicas do Nordeste do Brasil, realizou-se diluição seriada (1:100, 1:200, 1:400, 1:800) das amostras em ELISA. Para quantificação do anticorpo utilizou-se o resultado do rateio entre o valor da Densidade Ótica (DO) da diluição 1:200 dos soros analisados sobre o valor do *Cut off*. O *cut off* foi calculado a partir da média de todas as leituras negativas com 2 Desvios-padrão (+/- 2DP). Ou seja,  $Cut\ off = Média\ das\ DOs\ negativas + (+/-)\ 2DP$ . Assim:  $Anticorpos = DO\ soro\ (1:200) / Cut\ off$ .

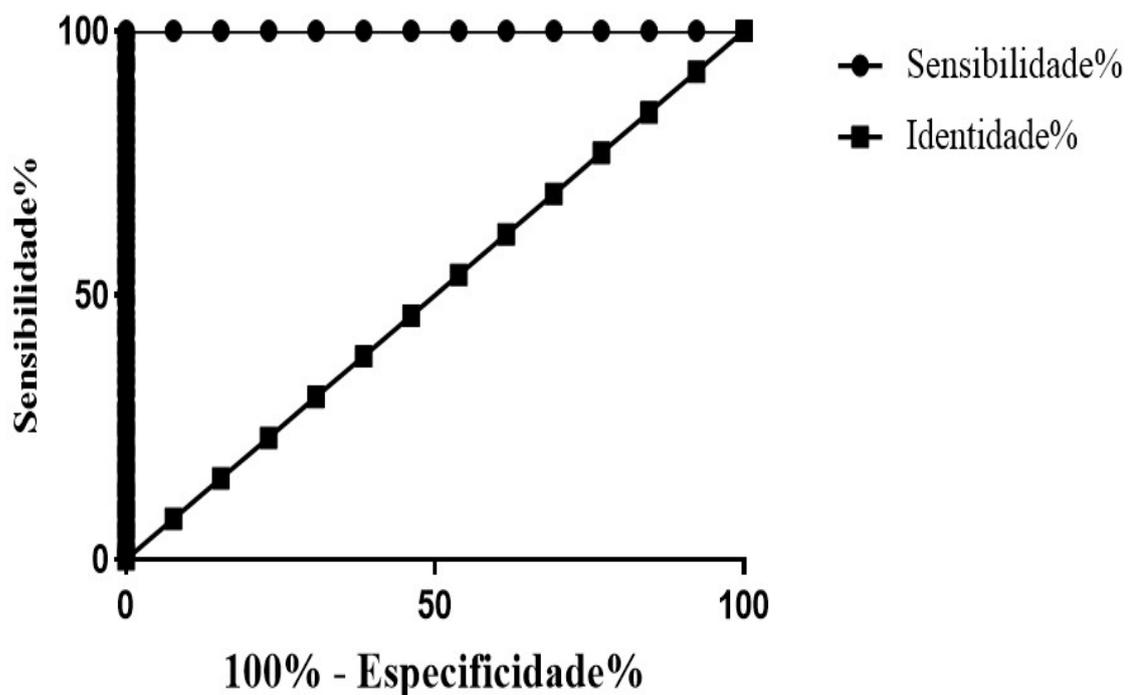
Avaliou-se por ELISA a atividade antigénica do extrato *L. infantum*, com a pesquisa de anticorpos IgG totais anti- *L. infantum* em 240 soros de indivíduos com Leishmaniose Visceral (Figura 19). Destes, 94,6% (227/240) foram serologicamente positivos para anticorpos IgG totais contra *L. infantum* e 5,4% (13/240) foram serologicamente negativos.



**Figura 19. Reatividade serológica anti-*Leishmania infantum* (Li-ELISA) de indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.** Li-ELISA foi utilizada na pesquisa de IgG total anti-*Leishmania infantum* em soros humanos de Leishmaniose Visceral (n=240). O nível de reatividade dos soros está representado em *box & violin*, indicando a média e o desvio padrão. As linhas pontilhadas azuis representam a média e medianas. A linha verde representa o *cut off*.

O resultado da curva ROC (Figura 20) validou o *Li-Elisa* utilizado na pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*L. infantum* em soros de indivíduos com Leishmaniose Visceral (n = 240), procedentes de áreas endêmicas do Nordeste do Brasil. Ao verificar a capacidade discriminatória entre amostras reativas e não reativas, a curva resulta numa área 100%, com erro padrão 0.0, o melhor ponto de corte foi determinado com sensibilidade de 99,5% (IC 95% = 97,56% a 99,99%) e especificidade de 100% (IC 95% = 75,29 % a 100,0%) e p valor < 0,0001.

*Li-ELISA* apresentou bom desempenho no diagnóstico de Leishmaniose Visceral em amostras de indivíduos com Leishmaniose Visceral. A área abaixo da curva foi de 100%, indicando que *Li-ELISA* apresentou boa capacidade na discriminação entre soros reativos e não reativos.

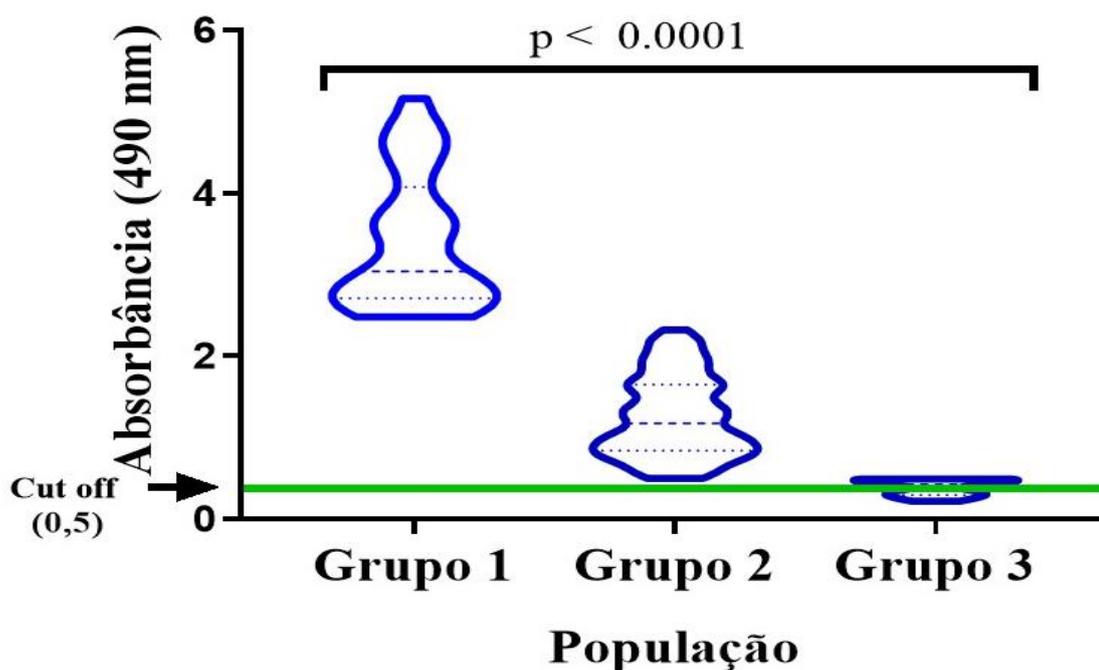


**Figura 20. Representação de curva ROC para teste Li-ELISA na pesquisa de anticorpos IgG totais em soros de indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.** A área sob a curva foi determinada com intervalo de confiança de 95%. O ponto de corte foi determinado com sensibilidade de 99,5% e especificidade de 100% e p valor < 0.0001.

Ao utilizar *Li*-ELISA em soros de indivíduos com Leishmaniose Visceral, configurou-se em *box & violin* (Figura 21) a presença de três grupos de reatividade serológica. O Grupo 1 (n = 24), apresentou valores de reatividades serológicas com densidades ópticas compreendidas entre 2.48 e 5.17; o Grupo 2 (n = 203), entre 0.50 e 2.33 e o Grupo 3 (n = 13) entre 0,22 e 0.49.

Dentre os grupos de reatividades serológicas formados, a maior parte da amostra analisada encontra-se no Grupo 2, cujas reatividades serológicas apresentaram densidades ópticas intermédias (0.50 e 2.33) entre os Grupos 1 e 3.

Analisando estatisticamente, foi verificada a normalidade das amostras pelo uso do teste de Kolmogorov-Smirnov. Encontrando ausência de normalidade, utilizou-se o teste, não paramétrico, Kruskal-Wallis para comparação estatística entre as amostras de cada país. Usando intervalo de confiança de 95%, ou seja,  $p < 0.05$ , verificou-se diferenças extremamente significativas entre os grupos de amostras com a obtenção de  $p < 0.0001$ .

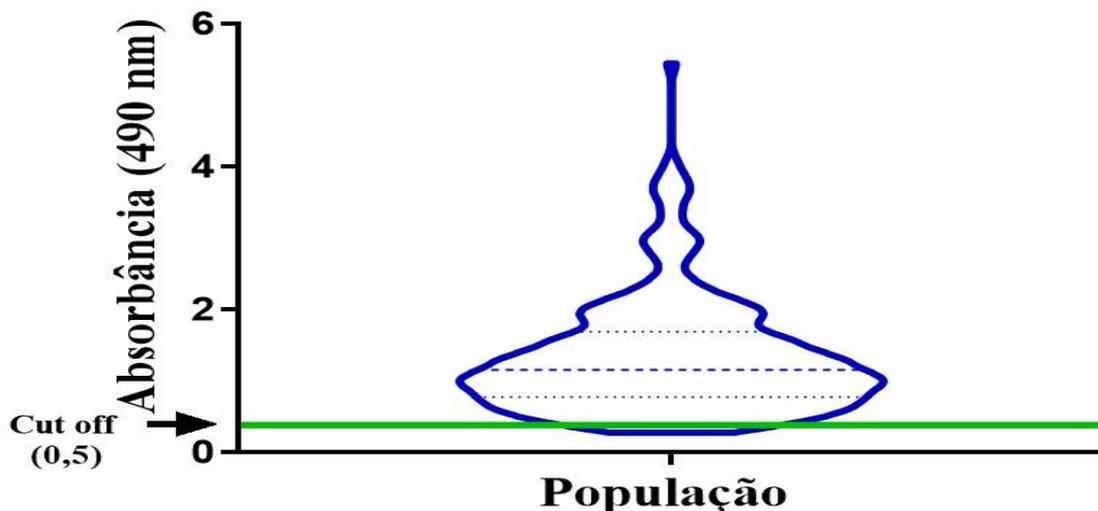


**Figura 21. Grupos de reatividade serológica anti-*Leishmania infantum* (Li-ELISA) de indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.** Foram constituídos três grupos de soros tendo em conta o nível reatividade serológica pelas densidades ópticas: Grupo 1 (n = 24), Grupo 2 (n = 203) e Grupo 3 (n = 13). Os resultados encontram-se representados em *box & violin*, indicando a média e o desvio padrão. As linhas pontilhadas azuis representam a média e medianas, em cada grupo. A linha verde representa o *cut off*. O teste de Kruskal-Wallis, foi utilizado na comparação estatística dos resultados, usando um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0.05$ ).  $P < 0.0001$  indica diferença extremamente significativa.

#### 4.4. Análise de reatividade serológica cruzada entre doença de Chagas e Leishmaniose Visceral: detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em indivíduos com doença de Chagas

Utilizou-se soros ( $n = 240$ ) de indivíduos infectados com doença de Chagas, procedentes de áreas endêmicas do Nordeste do Brasil, para pesquisar reatividade serológica cruzada com Leishmaniose Visceral. Aplicou-se, nestas amostras, extratos de *L. infantum*, em ELISA com o intuito de detetar anticorpos IgG totais anti-*L. infantum*.

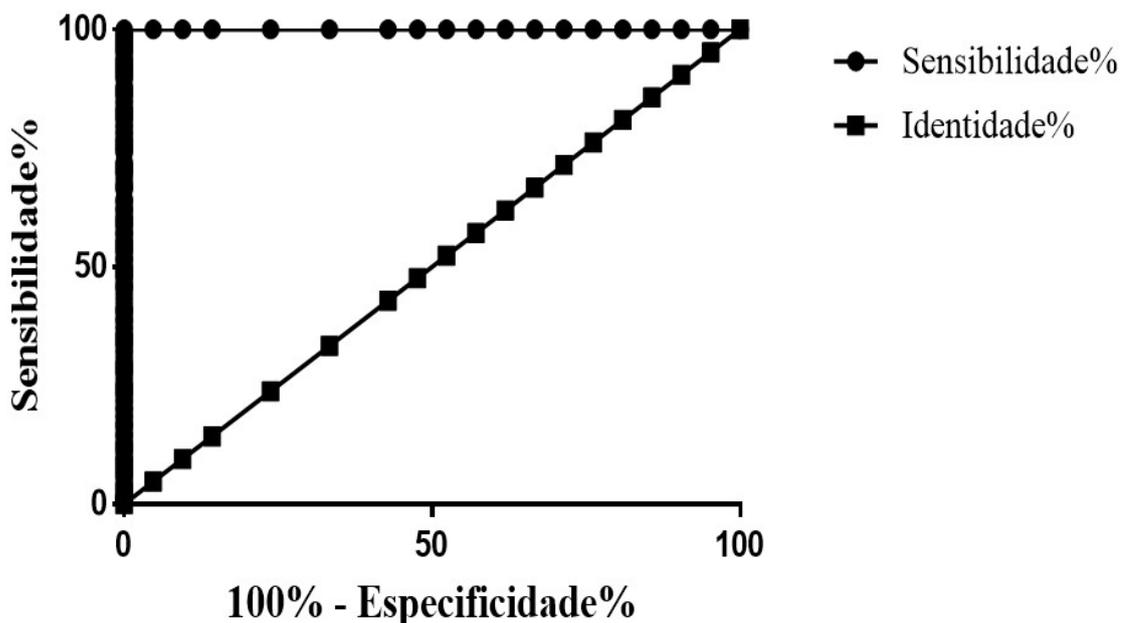
Realizou-se diluição seriada (1:100, 1:200, 1:400, 1:800) das amostras. Para quantificação do anticorpo utilizou-se o resultado do rateio entre o valor da Densidade Ótica (DO) da diluição 1:200 dos soros analisados sobre o valor do *Cut off*. O *cut off* foi calculado a partir da média de todas as leituras negativas com 2 Desvios-padrão (+/- 2DP). Ou seja,  $Cut\ off = Média\ das\ DOs\ negativas + (+/-)\ 2DP$ . Assim:  $Anticorpos = DO\ soro\ (1:200) / Cut\ off$ . Avaliou-se por ELISA a atividade antigénica do extrato *L. infantum*, com a pesquisa de anticorpos IgG totais anti- *L. infantum* em 240 soros de indivíduos com doença de Chagas (Figura 22). Destes, 91,2% (219/240) foram serologicamente positivos para anticorpos IgG totais contra *L. infantum* e 8,8% (21/240) foram serologicamente negativos.



**Figura 22. Reatividade serológica anti-*Leishmania infantum* (Li-ELISA) em indivíduos com doença de Chagas de área endémica brasileira.** Li-ELISA foi utilizada na pesquisa de IgG total anti-*Leishmania infantum* em soros humanos de doença de Chagas ( $n=240$ ). O nível de reatividade dos soros está representado em *box & violin*, indicando a média e o desvio padrão. As linhas pontilhadas azuis representam a média e medianas. A linha verde representa o *cut off*.

O resultado da curva ROC (Figura 23) validou o *Li-Elisa* utilizado na pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*L. infantum* em soros de indivíduos com doença de Chagas (n = 240), procedentes de áreas endêmicas do Nordeste do Brasil. Ao verificar a capacidade discriminatória entre amostras reativas e não reativas, a curva resultou numa área 100%, com erro padrão 0.0, o melhor ponto de corte foi determinado com sensibilidade de 99,5% (IC 95% = 97,48% a 99,99%) e especificidade de 100% (IC 95% = 83,89 % a 100,0%) e p valor < 0.0001.

*Li-ELISA* apresentou bom desempenho no diagnóstico de Leishmaniose Visceral em amostras de indivíduos com doença de Chagas. A área abaixo da curva foi de 100%, indicando que *Li-ELISA* apresentou boa capacidade na discriminação entre soros reativos e não reativos.



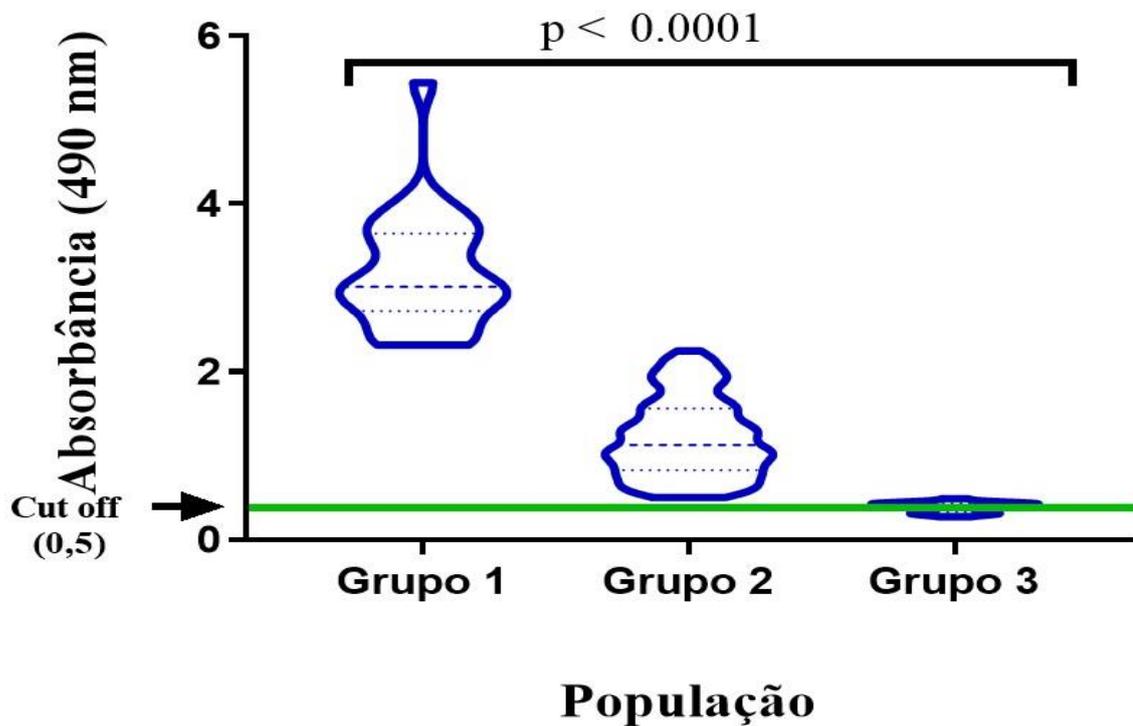
**Figura 23. Representação de curva ROC para teste *Li-ELISA* na pesquisa de anticorpos IgG totais em soros de indivíduos com doença de Chagas de área endêmica brasileira.** A área sob a curva foi determinada com intervalo de confiança de 95%. O ponto de corte foi determinado com sensibilidade de 97,4% e especificidade de 100% e p valor < 0.0001.

Ao utilizar *Li-ELISA* em soros de indivíduos com doença de Chagas, configurou-se em *box & violin* (Figura 24) a presença de três grupos reatividade serológica. O Grupo 1 (n = 25), apresentou valores de reatividades serológicas com densidades óticas

compreendidas entre 2.32 e 5.45; o Grupo 2 (n = 194), entre 0.50 e 2.25 e o Grupo 3 (n = 21) entre 0.27 e 0.49.

Dentre os grupos de reatividades serológicas formados, a maior parte da amostra analisada encontra-se no Grupo 2, cujas reatividades serológicas apresentaram densidades ópticas intermédias (0.50 e 2.25) entre os Grupos 1 e 3.

Analisando estatisticamente, foi verificada a normalidade das amostras pelo uso do teste de Kolmogorov-Smirnov. Encontrando ausência de normalidade, utilizou-se o teste, não paramétrico, Kruskal-Wallis para comparação estatística entre as amostras de cada país. Usando intervalo de confiança de 95%, ou seja,  $p < 0.05$ , verificou-se diferenças extremamente significativas entre os grupos de amostras com a obtenção de  $p < 0.0001$ .



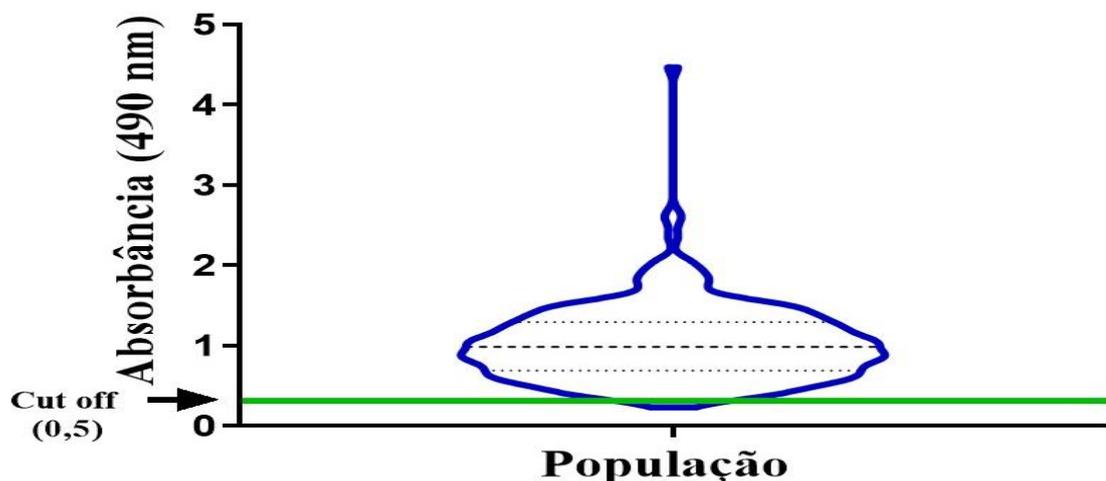
**Figura 24. Grupos de reatividade serológica anti-*Leishmania infantum* (Li-ELISA) de indivíduos com doença de Chagas de área endêmica brasileira.** Foram constituídos três grupos de soros tendo em conta o nível de reatividade serológica pelas densidades ópticas: Grupo 1 (n = 25), Grupo 2 (n = 196) e Grupo 3 (n = 21). Os resultados encontram-se representados em *box & violin*, indicando a média e o desvio padrão. As linhas azuis representam a média e medianas, em cada grupo. A linha verde representa o *cut off*. O teste de Kruskal-Wallis, foi utilizado na comparação estatística dos resultados, usando um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).  $P < 0.0001$  indica diferença extremamente significativa.

#### 4.5. Análise de reatividade serológica cruzada entre doença de Chagas e Leishmaniose Visceral: detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em indivíduos com Leishmaniose Visceral

Utilizou-se soros ( $n = 240$ ) de indivíduos infetados com Leishmaniose Visceral procedentes de áreas endêmicas do Nordeste do Brasil para pesquisar reatividade serológica cruzada com doença de Chagas. Aplicou-se, nestas amostras, extratos de *T. cruzi*, em ELISA com o intuito de detetar anticorpos IgG totais anti- *T. cruzi*

Realizou-se diluição seriada (1:100, 1:200, 1:400, 1:800) das amostras. Para quantificação do anticorpo utilizou-se o resultado do rateio entre o valor da Densidade Ótica (DO) da diluição 1:200 dos soros analisados sobre o valor do *Cut off*. O *cut off* foi calculado a partir da média de todas as leituras negativas com 2 Desvios-padrão (+/- 2DP). Ou seja,  $Cut\ off = Média\ das\ DOs\ negativas + (+/-)\ 2DP$ . Assim:  $Anticorpos = DO\ soro\ (1:200) / Cut\ off$ .

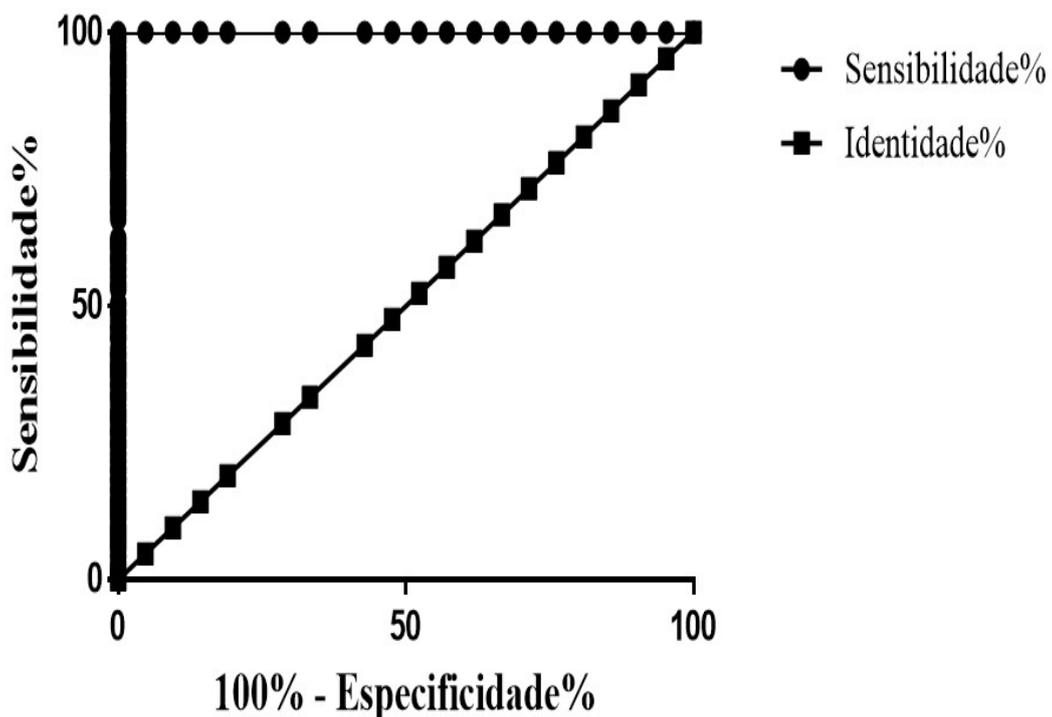
Avaliou-se por ELISA a atividade antigénica do extrato *T. cruzi*, com a pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*T. cruzi* em 240 soros com Leishmaniose Visceral (Figura 25). Destes, 91,2% (219/240) foram serologicamente positivos para anticorpos IgG totais contra *T. cruzi* e 8,8% (21/240) foram serologicamente negativos.



**Figura 25. Reatividade serológica anti-*Trypanosoma cruzi* (Tc-ELISA) em indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.** Tc-ELISA foi utilizada na pesquisa de IgG total anti-*Trypanosoma cruzi* em soros humanos de Leishmaniose Visceral ( $n=240$ ). O nível de reatividade dos soros está representado em *box & violin*, indicando a média e o desvio padrão. As linhas azuis representam a média e medianas. A linha verde representa o *cut off*.

O resultado da curva ROC (Figura 26) validou o *Tc*-Elisa utilizado na pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*T. cruzi* em soros de indivíduos com Leishmaniose Visceral procedentes de áreas endêmicas do Nordeste do Brasil. Ao verificar a capacidade discriminatória entre amostras reativas e não reativas, a curva resultou numa área 100%, com erro padrão 0.0, o melhor ponto de corte foi determinado com sensibilidade de 99,5% (IC 95% = 97,48% a 99,99%) e especificidade de 100% (IC 95% = 83,89 % a 100,0%) e p valor < 0.0001.

*Tc*-ELISA apresentou bom desempenho no diagnóstico de doença de Chagas em amostras de indivíduos com Leishmaniose Visceral. A área abaixo da curva foi de 100%, indicando que *Tc*-ELISA apresentou boa capacidade na discriminação entre soros reativos e não reativos.

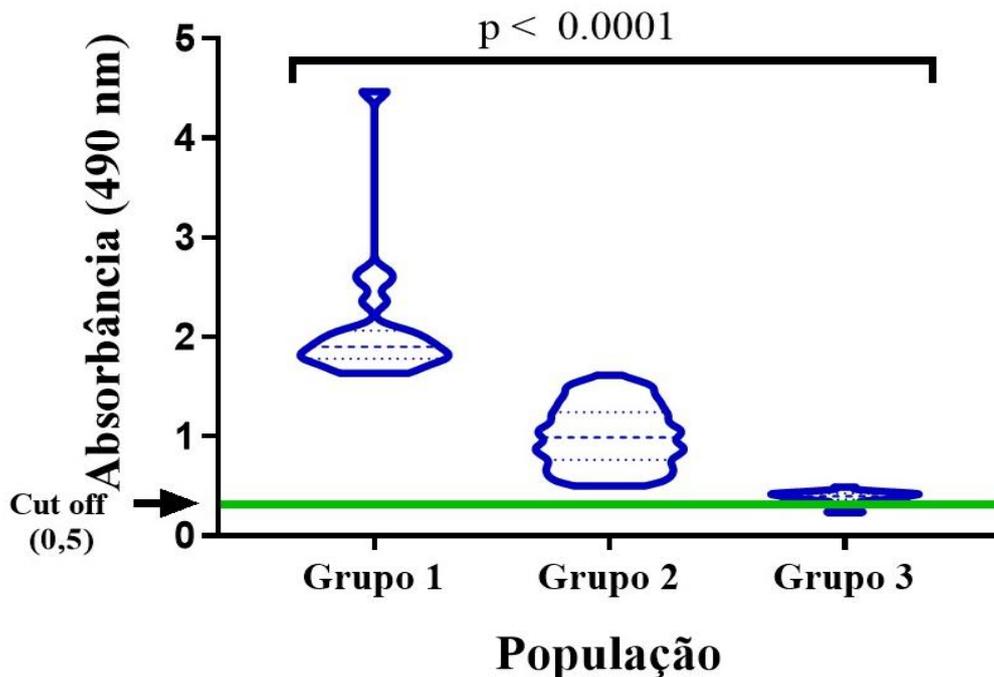


**Figura 26. Representação de curva ROC para teste Tc-ELISA na pesquisa de anticorpos IgG totais em soros de indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.** A área sob a curva foi determinada com um intervalo de confiança de 95%. O ponto de corte foi determinado com sensibilidade de 99,5% e especificidade de 100% e p valor < 0,0001.

Ao utilizar *T. cruzi* em soros de indivíduos com Leishmaniose Visceral, configurou-se em *box & violin* (Figura 27) a presença de três grupos de reatividade serológica. O Grupo 1 (n = 19), apresentou valores de reatividades serológicas com densidades ópticas compreendidas entre 1.63 e 4.47; o Grupo 2 (n = 200), entre 0.50 e 1.62 e o Grupo 3 (n = 21) entre 0.23 e 0.49.

Dentre os grupos de reatividades serológicas formados, a maior parte da amostra analisada encontra-se no Grupo 2, cujas reatividades serológicas apresentaram densidades ópticas intermédias (0.50 e 1.62) entre os Grupos 1 e 3.

Analisando estatisticamente, foi verificada a normalidade das amostras pelo uso do teste de Kolmogorov-Smirnov. Encontrando ausência de normalidade, utilizou-se o teste, não paramétrico, Kruskal-Wallis para comparação estatística entre as amostras de cada país. Usando intervalo de confiança de 95%, ou seja,  $p < 0.05$ , verificou-se diferenças extremamente significativas entre os grupos de amostras com a obtenção de  $p < 0.0001$ .



**Figura 27. Grupos de reatividades serológicas anti-*Trypanosoma cruzi* (Tc-ELISA) em indivíduos com Leishmaniose Visceral de área endêmica brasileira.** Foram constituídos três grupos de soros tendo em conta o nível reatividade serológica pelas densidades óticas: Grupo 1 (n = 19), Grupo 2 (n = 200) e o Grupo 3 (n = 21). Os resultados encontram-se representados em *box & violin*, indicando a média e o desvio padrão. As linhas azuis representam a média e medianas, em cada grupo. A linha verde representa o *cut off*. O teste de Kruskal-Wallis, foi utilizado na comparação estatística dos resultados, usando um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).  $P < 0,0001$  indica diferença extremamente significativa.

## **5. Discussão**



## 5. DISCUSSÃO

A doença de Chagas é atualmente um problema de saúde pública global, como consequência da imigração de indivíduos provenientes de áreas endêmicas primárias para áreas não endêmicas (Abrás *et al.*, 2016). A incessante migração de indivíduos de áreas endêmicas tem provocado, nas últimas décadas, preocupação em países, como Canadá, EUA, da Europa, Austrália e Japão. Nesses locais, considerados não endêmicos, a transmissão ocorre sobretudo por transplante de órgãos, transfusão sanguínea ou transmissão congênita (Lidani *et al.*, 2019). Em áreas endêmicas, *T. cruzi* é transmitido especialmente por contato com os dejetos dos insetos triatomíneos hematófagos e, ocasionalmente, por transmissão oral através de alimentos e bebidas contaminadas. As formas crônicas da doença têm sido registradas em países que não são considerados endêmicos para esta doença, assim como, as formas agudas, particularmente, devido a transmissão vertical. No continente Europeu, as formas crônicas são mais numerosas que as ocorrências congênitas (Abrás *et al.*, 2016).

A OMS preconiza que um teste serológico ideal para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas deve ser fácil de realizar, de preferência numa única etapa e de rápida execução. Assim, não torna-se necessário o uso de equipamentos especiais ou de refrigeração de reagentes. O teste, deve apresentar 100% de sensibilidade e de especificidade e ser acessível às populações, de baixo custo. Atualmente, não existe, ainda o teste, para a doença de Chagas com estas especificações. Por outro lado, a ausência de um teste serológico de referência para o diagnóstico complementar da infecção por *T. cruzi* estimula a investigação sobre o desenvolvimento de testes laboratoriais que apresentem maior sensibilidade e especificidade, assegurando um diagnóstico com maior precisão (Abrás *et al.*, 2016).

A evolução natural da infecção por *T. cruzi* está intimamente ligada à eficiência do diagnóstico parasitológico e serológico da doença de Chagas. A eficácia do diagnóstico parasitológico é evidenciada, na fase aguda da doença, pela demonstração da presença do parasita. Porém, a grande maioria dos doentes são diagnosticados na fase crônica. Nesta fase, a serologia, permite demonstrar indiretamente a presença da infecção pelo *T. cruzi* através da detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, sendo a metodologia mais adequada ao diagnóstico laboratorial (Flores-Chávez *et al.*, 2010). Apesar de existirem diversos testes que são correntemente utilizados para a detecção de anticorpos

específicos anti-*T. cruzi*, ainda não há consenso sobre uma técnica de referência. No entanto, trabalhos realizados no Cone Sul da América do Sul referem uma elevada eficiência dos kits comerciais fabricados nesse local. Em contrapartida, estudos realizados no norte da América do Sul e na América Central demonstraram que a utilização de antigénios preparados a partir de estirpes de *T. cruzi* isoladas nessas áreas conduzem ao aumento da sensibilidade dos testes para detecção de anticorpos. Este fato parece estar associado à prevalência do genótipo Tc I de *T. cruzi* no norte da América do Sul e na América Central e na dispersão alargada do genótipo Tc II nos países do Cone Sul (Flores-Chávez *et al.*, 2010; Zingales, 2018). Alguns autores supõem que as diferenças na distribuição geográfica dos genótipos do parasita, influenciam na variação da resposta imunitária dos indivíduos infetados (Flores-Chávez *et al.*, 2010).

Estudo realizado com indivíduos de diferentes áreas geográficas da Colômbia, mostrou que resultados positivos em testes RIFI e ELISA foram concordantes com resultados de teste comercial (ELISA), mesmo utilizando antigénios distintos. Os testes RIFI e ELISA utilizados continham antigénio total de epimastigotas de *T. cruzi* e o teste comercial a proteína de fusão TcF (que apresentava epítomos de proteínas expressos na superfície de formas tripomastigotas de estirpes de *T. cruzi* - DTU I, II, V e VI). Resultados positivos em testes RIFI e ELISA concordaram em 96,1% (75/78) das amostras analisadas com os do teste comercial. A concordância também se deu com pacientes assintomáticos em 97,2% das amostras desses indivíduos (35/36) e com pacientes sintomáticos em 95,2% das amostras dos mesmos (40/42). Ainda, 100% (21/21) das amostras com resultados negativos em RIFI e ELISA, também foram negativos no teste comercial. Estes resultados evidenciam que mesmo utilizando antigénios com formas morfológicas e preparações distintas, anticorpos específicos para *T. cruzi* são detetados (Llano *et al.*, 2014).

O tipo de antigénio utilizado é uma particularidade muito importante para que um teste diagnóstico seja considerado simples e útil. Um antigénio deve: i) apresentar um bom desempenho, que consiste na discriminação de amostras positivas; ii) ser simples de ser produzido, que deve ocorrer a partir de métodos práticos e sem procedimentos trabalhosos e difíceis (Berrizbeitia *et al.*, 2012). O ensaio ELISA é comumente utilizado para detetar e quantificar anticorpos em amostras serológicas, sendo bastante útil em estudos seroepidemiológicos devido ao fato de permitir o processamento de uma

grande quantidade de amostras de forma relativamente rápida. A especificidade do teste é garantida pela qualidade do antígeno adsorvido à placa e a sensibilidade pela concentração das proteínas presentes no antígeno. O antígeno utilizado influencia proporcionalmente a especificidade e sensibilidade de um teste ELISA (Rodrigues *et al.*, 2014).

No presente estudo, soros de indivíduos de áreas endêmicas brasileiras de doença de Chagas e de Leishmaniose Visceral, foram caracterizados por teste ELISA - *in house* - utilizando como antígenos extratos de tripomastigotas de *T. cruzi* (estirpe Y) – *Tc*-ELISA - e de promastigotas de *L. infantum* – *Li*-ELISA. O desempenho da *Tc*-ELISA foi particularmente bom na discriminação entre soros negativos e positivos para doença de Chagas assim como a *Li*-ELISA na discriminação de soros negativos e positivos para Leishmaniose Visceral. Os extratos foram simples, fáceis e pouco dispendiosos de serem produzidos. Revelaram muito bom rendimento das proteínas, com ótimas concentrações proteicas e, além disso, demonstraram muito boa sensibilidade e especificidade em ELISA concordando com o que preconiza estudos anteriores (Berrizbeitia *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2014). Portanto, o extrato produzido em nosso laboratório influenciou positivamente o presente estudo porquanto conseguiu diferenciar e qualificar amostras de doença de Chagas e de Leishmaniose Visceral.

Alguns trabalhos já demonstraram que o uso de antígenos preparados a partir de cepas isoladas de regiões endêmicas, promove o aumento da sensibilidade dos testes e da detecção de anticorpos. Esse fato fundamenta-se no conhecimento do genótipo da cepa e da zona de onde foi isolado o parasita. Contudo, outros autores pressupõem que as diferenças na distribuição geográfica dos genótipos dos parasitas, influenciam na variação da resposta imunológica dos indivíduos afetados (Florez-Chavez *et al.*, 2010).

O desempenho dos testes convencionais é condicionado pela forma de preparação do antígeno a partir de diferentes estirpes, circulando em diferentes áreas de endemicidade, ou seja, a sensibilidade do teste varia de acordo com a área geográfica das amostras que forem analisadas. Assim, a variabilidade genética de isolados de *T. cruzi* pode também ocorrer por conta da procedência das amostras (Florez-Chavez *et al.*, 2012).

No corrente estudo, os resultados da caracterização serológica, em ELISA, de amostras de áreas endêmicas concordam com os de um estudo (Santos *et al.*, 2012) no qual

utilizou amostras de indivíduos com doença de Chagas, oriundos de áreas endêmicas, caracterizados serologicamente por testes ELISA e HAI. O antígeno da cepa Y de *T. cruzi*, foi utilizado em ELISA *in house* para pesquisa de IgG total anti-*T. cruzi*. A ELISA foi capaz de discriminar indivíduos com infecção por *T. cruzi* de indivíduos com ausência de infecção por *T. cruzi*, com índices satisfatórios de desempenho, demonstrados pela curva ROC, com sensibilidade e especificidade de 100%. Portanto, de forma semelhante, nesta pesquisa, as amostras de doença de Chagas selecionadas, de área endêmica, foram reativas para *T. cruzi* em ELISA, concordando com os testes serológicos convencionais – RIFI e HAI - que as caracterizaram previamente. Deste modo, verificou-se a concordância dos resultados da ELISA com os de outros testes serológicos convencionais quando utilizado na detecção de *T. cruzi*.

Em tempos atrás, a avaliação de antígenos para serem utilizados, em testes diagnósticos, na discriminação entre doença de Chagas e leishmaniose era realizada pela utilização de critérios epidemiológicos ou técnicas imunoquímicas. Até o momento, não existe um ensaio diagnóstico que seja “*gold-standard*” para a discriminação da infecção por *T. cruzi* de infecção por *Leishmania* spp. ou de uma infecção mista entre ambos (Vega Benedetti *et al.*, 2013).

Nesse estudo, extratos produzidos em laboratório foram utilizados na pesquisa de reação cruzada entre *T. cruzi* e *L. infantum* de amostras de regiões endêmicas, brasileiras. *Li*-ELISA detetou anticorpos anti-*L. infantum* em soros de doença de Chagas e *Tc*-ELISA detetou anticorpos anti-*T. cruzi* em soros de Leishmaniose Visceral. Esses resultados concordam com estudos que documentaram que kits de serodiagnósticos baseados na utilização de antígenos brutos demonstraram reatividade cruzada entre soros de pacientes infetados com *T. cruzi* e soros de pacientes infetados com *Leishmania* spp. (Gupta *et al.*, 2013).

Com os resultados serológicos agrupados por níveis de reatividade, os grupos de resultados formados na seroteca de doença de Chagas quando utilizou-se *Tc*-ELISA e *Li*-ELISA, respectivamente, demonstraram semelhança entre os níveis de reatividades, assim como também na quantidade de amostras reconhecidas por ambos antígenos. Isso significa que soros de doença de Chagas reconheceram o antígeno *L. infantum* tanto quanto reconheceram o antígeno *T. cruzi*, em proporções equivalentes e esse fato pode se dar pela presença de proteínas comuns a ambos os parasitas. O mesmo se deu

com os soros de Leishmaniose Visceral, ou seja, os grupos de resultados formados nesta seroteca quando utilizou-se *Li*-ELISA e *Tc*- ELISA, respectivamente, demonstraram semelhança entre os níveis de reatividades, assim como também na quantidade de amostras reconhecidas por ambos antígenos. Isso implica que soros de Leishmaniose Visceral reconheceram o antígeno *T. cruzi* tanto quanto reconheceram o antígeno *L. infantum* em proporções equivalentes e esse reconhecimento mútuo pode se dar pela presença de proteínas comuns a ambos os parasitas.

Evidências apontam que as estirpes parasitárias, de *T. cruzi*, presentes nos indivíduos infectados retratam as DTUs circulantes por entre os ciclos “domésticos/peridomiciliares” da área geográfica relacionada. Já foram isoladas de amostras clínicas, DTUs de *T. cruzi*, Tc I, Tc II, Tc V e Tc VI (Balouz *et al.*, 2017). As DTUs associadas à doença humana na Argentina são Tc V e Tc VI e no México, Tc I (Zingales, 2018). Amostras brasileiras utilizadas neste estudo foram coletadas no Estado do Rio Grande do Norte que fica a nordeste, região oriental do Brasil, portanto, podemos inferir hipoteticamente que estas amostras clínicas contêm Tc II pois de acordo com estudos recentes Tc II é a DTU que causa doença abundantemente na região central e oriental do Brasil (Zingales, 2018).

O padrão de especificidade de um anticorpo está estreitamente relacionado com a seqüência primária de aminoácidos que vão formar as cadeias pesadas e leves numa organização espacial e que terá a capacidade de ligar-se a uma estrutura antigênica. Cada molécula de anticorpo exibe particular habilidade interna de se ligar a vários motivos antigênicos, ou seja, cada anticorpo reconhece vários epítomos de um determinado antígeno. A especificidade de um anticorpo é conseguida quando a soma de ligações específicas a certo determinante antigênico é claramente superior às ligações de reação cruzada com uma diversidade de estruturas diferentes, o que é caracteristicamente alcançado em antissoros policlonais (Saba *et al.*, 2013). Indivíduos com Leishmaniose Visceral demonstram elevado grau de ativação policlonal que provoca forte seroreatividade cruzada em testes convencionais utilizados no diagnóstico de infecção por *T. cruzi* (Florez-Chavez *et al.*, 2012). Ao utilizar extrato parasitário como antígeno bruto em testes serológicos, coloca-se uma série de proteínas altamente conservadas de *T. cruzi* e *Leishmania* spp., que são parasitas filogeneticamente

relacionados, que possibilitam a reação cruzada antigénica (Vega Benedetti *et al.*, 2013).

Diversos estudos vêm mostrando que a presença de proteínas repetitivas dos parasitas são, comumente, alvos de resposta de células B do hospedeiro, podendo promover o aumento da eficiência dos testes utilizados no diagnóstico de doenças parasitárias. Por exemplo, parasitas do complexo *L. donovani* expressam antígenos repetitivos, os quais promovem uma ampla formação de imunoglobulinas específicas contra essas porções repetitivas, nos indivíduos com leishmaniose. Assim, diversas cópias de motivos repetitivos provocam uma maior exposição ao sistema imune do hospedeiro, resultando na produção de anticorpos que reconhecem estas porções repetitivas com maior avidéz (Dhom-Lemos *et al.*, 2019).

O ensaio *Immunoblotting* foi introduzido por Towbin, em 1979, para análise de proteínas e além de possibilitar a obtenção de dados sobre a massa molecular permite também mensurar a quantidade relativa de uma proteína específica em uma determinada amostra. Baseia-se no princípio de separação das proteínas por massa molecular através de eletroforese em gel de poliacrilamida (*poliacrilamide gel electrophoresis*, PAGE), seguida por uma transferência para uma membrana e posterior detecção de proteínas de interesse com anticorpo específico. Apresenta cinco fases: 1) extração e quantificação das proteínas; 2) PAGE; 3) transferência das proteínas para uma membrana; 4) incubação da membrana com um anticorpo para detectar proteínas específicas; 5) revelação da membrana para análise dos dados.

Análises de antígenos através de *immunoblotting* para serem utilizados em testes diagnósticos de doença de Chagas vêm sendo feitas há muito tempo e desde então, já se verifica a presença de reatividade cruzada entre doença de Chagas. Em 1987, Dos Santos *et al.*, utilizaram promastigotas de *Leishmania donovani chagasi* (denominação do parasita à época) como fonte antigénica, analisando 20 soros de pacientes com Leishmaniose Visceral Americana e 10 com doença de Chagas crônica. Os soros de Leishmaniose Visceral Americana reconheceram um máximo de 36 componentes, entre os quais, os autores verificaram que 6 foram mais fortemente visíveis, cujos pesos moleculares foram 35, 39, 49, 52, 71 e 86 kDa. Os soros de doença de Chagas reconheceram 22 componentes, cujos pesos moleculares variaram entre 18,5 e 112 kDa. Correlacionando as frações proteicas prováveis de serem causadoras de reação cruzada

entre *T. cruzi* e *L. infantum*, nas amostras deste estudo, vistas em soros de doença de Chagas nota-se a similaridade dos pesos moleculares encontrados em amostras de LVA. Em 1996, Vexenat *et al.*, pesquisaram reatividade cruzada entre doença de Chagas e Leishmaniose Visceral, por testes serológicos e *immunoblotting*. Foram utilizados como fonte antigénica, epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. chagasi* e analisados 64 soros positivos serologicamente para doença de Chagas e 40 positivos para Leishmaniose Visceral, confirmados laboratorialmente com achados de amastigotas de *Leishmanias* em amostras de medula óssea e/ou de cultura. Os testes serológicos utilizados, foram ELISA, HAI, RIFI e DAT. No presente estudo, no ensaio ELISA, quando *T. cruzi* foi o antígeno, em amostras de doença de Chagas, foram reconhecidas 15% (6/40) de amostras com Leishmaniose Visceral e quando *L. chagasi* foi a fonte antigénica, em amostras de Leishmaniose Visceral, foram reconhecidas 98% (62/64) de amostras com doença de Chagas. Na análise de *immunoblotting*, o antígeno *T. cruzi* em soros de doença de Chagas, demonstrou a presença de 24 bandas, com pesos moleculares compreendidos entre 7 e 245 kDa. Em soros de Leishmaniose Visceral, o mesmo antígeno, reconheceu 14 bandas antigénicas. O antígeno *L. chagasi*, em soros de Leishmaniose Visceral, mostrou 29 bandas antigénicas, cujos pesos moleculares apresentaram-se entre 8 e 250 kDa. Em soros de doenças de Chagas, esse mesmo antígeno reconheceu 13 bandas antigénicas. O estudo concluiu que as bandas antigénicas 250, 220, 133, 129, 123, 76 e 64 kDa eram as de interesse na pesquisa de reacção cruzada entre doença de Chagas e Leishmaniose Visceral pois foram as bandas que se apresentaram entre os soros de ambas patologias.

Num estudo realizado na Espanha (Riera *et al.*, 2012), através de *immunoblotting*, 37 soros foram confirmados de indivíduos com doença de Chagas e 27 soros confirmados com Leishmaniose Visceral por *L. infantum*, além de 55 soros negativos para *T. cruzi* e *Leishmania*. O diagnóstico de doença de Chagas foi feito por dois ensaios ELISA, um teste comercial com antígeno recombinante e um ensaio *in house* com antígeno bruto de epimastigota de *T. cruzi* e o de Leishmaniose Visceral, com a detecção de parasitas na medula óssea e pela utilização de teste ELISA e *immunoblotting*. Todos os soros de pacientes chagásicos demonstraram um padrão homogêneo de bandas, independente dos valores de título em ELISA (alto, intermediário ou baixo) constituído por seis bandas antigénicas equivalentes a 28, 32, 38, 39, 40 e 48 kDa. Os soros de pacientes com

Leishmaniose Visceral apresentaram um padrão heterogêneo de bandas consistindo em frações de 20, 21, 23, 24, 34, 36, 44, 46, 48, 52, 56, 58, 60, 62, 66, 76, 86 e 96 kDa. Uma vez que o padrão homogêneo visto nos soros chagásicos foi claramente diferenciado do padrão heterogêneo mostrado pelos soros de doentes com Leishmaniose Visceral Zoonótica (LVZ), observamos que nos *pools* de soros analisados nesse estudo que evidenciaram a reatividade cruzada, foram encontradas bandas proteicas de 20, 50 e 85 kDa, que se inserem entre as bandas que surgiram nos soros de pacientes chagásicos e leishmanióticos, do estudo relatado, demonstrando, de facto, a reação cruzada entre *T. cruzi* e *L. infantum*. Na América Central e do Sul o diagnóstico de doença de Chagas tem sido feito através da análise por *immunoblotting*, empregando várias estirpes parasitárias e diferentes preparações antigénicas. A heterogeneidade das cepas e preparações antigénicas, além do tamanho dos géis, das concentrações de poliacrilamida e diferentes marcadores de peso molecular proporcionam mais variações na separação das bandas e na determinação dos respectivos pesos moleculares, constituindo fatores limitantes dessa técnica (Riera *et al.*, 2012). Pela análise de *immunoblotting*, no correspondente estudo foram encontradas diferenças nos pesos moleculares dos antígenos quando o método utilizado foi comparado com os de outros estudos que partilharam fontes antigénicas semelhantes mas com formas morfológicas diferentes (epimastigotas de *T. cruzi*). A ausência de pesquisas utilizando a mesma forma morfológica da fonte antigénica utilizada no correspondente estudo, dificulta análises comparativas e infere a necessidade de realização de mais estudos. Produzir em laboratório, extratos de fontes antigénicas provenientes de áreas endémicas, com tripomastigotas de *T. cruzi*) para serem testados em ensaios convencionais no cruzamento de amostras de doença de Chagas e Leishmaniose Visceral para a pesquisa de reação cruzada entre os parasitas *T. cruzi* e *L. infantum* e comparar com testes comerciais que utilizem a mesma fonte antigénica e forma morfológica. Porém, verificou-se que a imunotransferência é uma ferramenta laboratorial que pode ajudar na identificação de proteínas imunogénicas a serem usadas como biomarcadores para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da doença de Chagas. Também se faz necessária a confirmação dos resultados pela utilização de abordagens mais avançadas, como por exemplo, proteômica e espectrometria de massa, além de análises de bioinformática. Por fim, a análise *in vitro* promove o direcionamento e estratégias de

análises *in vivo*, utilizando parasitas cultivados em laboratório e amostras de áreas endêmicas.



## **6. Conclusões**



## 6. CONCLUSÕES:

- ELISAs *in house*, para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e anticorpos anti-*Leishmania infantum* foram otimizados.
- ELISAs *in house* otimizados, detetam anticorpos anti-*Trypanosma cruzi* e anti-*Leishmania infantum* em população caracterizada com doença de Chagas e Leishmaniose Visceral, respectivamente.
- ELISAs *in house* otimizados, detetam reatividade serológica cruzada entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* pois, neste trabalho, antigénios *Trypanosoma cruzi* foram reconhecidos por anticorpos IgG contra *Leishmania infantum* e antigénios *Leishmania infantum* foram reconhecidos por anticorpos IgG contra *Trypanosoma cruzi*.
- Por não se identificar anticorpos responsáveis pela reatividade serológica cruzada no diagnóstico laboratorial de doença de Chagas e Leishmaniose Visceral aconselha-se realizar identificação imunoquímica e molecular dos mesmos.



# **7. Perspectivas Futuras**



## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Vários estudos detetam a reação serológica cruzada entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*, no diagnóstico laboratorial da doença de Chagas e Leishmaniose Visceral, porém, não demonstram, de fato, porque ocorre a reatividade cruzada. A pesquisa pela identificação de proteínas responsáveis pela reatividade serológica cruzada entre os parasitas analisados é de fundamental importância no esclarecimento desta questão, podendo utilizar técnicas como Western blot ou outras, tais como proteômicas que poderão permitir a identificação dos mecanismos que estão por trás da reatividade cruzada. O conhecimento acerca das proteínas que promovem a reatividade cruzada no diagnóstico das doenças de Chagas e Leishmaniose Visceral, poderá levar à sua utilização como estratégias no desenvolvimento de novos testes que apresentem uma maior especificidade analítica e elevada sensibilidade no diagnóstico de ambas doenças.



# **8. Referências** **Bibliográficas**



**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

- Abras, A. *et al.* (2016) ‘Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a’, *Journal of clinical microbiology*, 54(6), pp. 1566–1572. doi: 10.1128/JCM.00142-16.Editor.
- Ackermann, A. A. *et al.* (2012) ‘A genomic scale map of genetic diversity in *Trypanosoma cruzi*’, *BMC Genomics*, 13(1), p. 736. doi: 10.1186/1471-2164-13-736.
- Akhoundi, M. *et al.* (2016) ‘A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. doi: 10.1371/journal.pntd.0004349.
- Abeijon, C. *et al.* (2012) ‘Identification and Diagnostic Utility of *Leishmania infantum* Proteins Found in Urine Samples from Patients with Visceral Leishmaniasis’, *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(6), pp. 935–943. doi: 10.1128/cvi.00125-12.
- Alessio, G. D. *et al.* (2018) ‘Accomplishing the genotype-specific serodiagnosis of single and dual *Trypanosoma cruzi* infections by flow cytometry Chagas-Flow ATE-IgG2a’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(2), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pntd.0006140.
- Alvar, J. *et al.* (2012) ‘Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence’, *PLoS ONE*, 7(5). doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- Alviarez, Y. *et al.* (2014) ‘Estandarización de la técnica de aglutinación directa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas’, *Biomédica COMUNICACIÓN BREVE Biomédica*, 3434, pp. 308–17308. doi: 10.7705/biomedica.v34i2.2078.
- Araujo, F. G. (1986) ‘Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids’, *Infection and Immunity*, 53(1), pp. 179–185.
- Assis, T. S. M. de *et al.* (2008) ‘Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana’, *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 17(2), pp. 107–116. doi: 10.5123/s1679-49742008000200004.

- Balouz, V., Agüero, F. and Buscaglia, C. A. (2017) ‘Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps’, *Adv Parasitol.*, 97, p. doi:10.1016/bs.apar.2016.10.001. doi: 10.1016/bs.apar.2016.10.001.Chagas.
- Banjara, M. R. *et al.* (2012) ‘Visceral leishmaniasis clinical management in endemic districts of India, Nepal, and Bangladesh’, *Journal of Tropical Medicine*, 2012. doi: 10.1155/2012/126093.
- Bangert, M. *et al.* (2018) ‘Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(3), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pntd.0006277.
- Belo, V. S. *et al.* (2013) ‘Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4). doi: 10.1371/journal.pntd.0002182.
- Berger, B. A. *et al.* (2017) ‘Pathophysiology of *Leishmania* Infection during Pregnancy’, *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, 33(12), pp. 935–946. doi: 10.1016/j.pt.2017.08.012.
- Berrizbeitia, M. *et al.* (2012) ‘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’, *Journal of Tropical Medicine*, 2012. doi: 10.1155/2012/875909.
- Berná, L. *et al.* (2017) ‘Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*’, *PeerJ*, 5, p. e3017. doi: 10.7717/peerj.3017.
- Besuschio *et al.* (2017) ‘Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), p. e0005779. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005779>.
- Bezuneh, A. *et al.* (2014) ‘Comparison of point-of-care tests for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in east African patients’, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(6), pp. 1109–1115. doi: 10.4269/ajtmh.13-0759.

- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.', *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brener, Z. (2003) 'Biology of *Trypanosoma cruzi*', *Annual Review of Microbiology*, 27(1), pp. 347–382. doi: 10.1146/annurev.mi.27.100173.002023.
- Brossas, J. Y. *et al.* (2017) 'Secretome analysis of *Trypanosoma cruzi* by proteomics studies', *PLoS ONE*, 12(10), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0185504.
- Caballero, Z. C. *et al.* (2007) 'Evaluation of Serological Tests To Identify *Trypanosoma cruzi* Infection in Humans and Determine Cross-Reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp.', *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(8), pp. 1045–1049. doi: 10.1128/CVI.00127-07.
- Carrea, A. and Diambra, L. (2016) 'Systems biology approach to model the life cycle of *Trypanosoma cruzi*', *PLoS ONE*, 11(1), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0146947.
- Carvalho, A. M. R. S. *et al.* (2018) 'New antigens for the serological diagnosis of human visceral leishmaniasis identified by immunogenomic screening', *PLoS ONE*, 13(12), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0209599.
- Castanheira Bartholomeu, D. *et al.* (2014) 'Unveiling the Intracellular Survival Gene Kit of Trypanosomatid Parasites', *PLOS Pathogens*, 10(12), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.ppat.1004399.
- Castro-Júnior, J. G. *et al.* (2014) 'Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP®) and PCR assays', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(3), pp. 225–229. doi: 10.1590/s0036-46652014000300008.
- Celeste, B. J. *et al.* (2014) 'Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous mucosal, visceral leishmaniases', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. doi: 10.4269/ajtmh.13-0623.
- Chanmol, W. *et al.* (2019) 'Axenic amastigote cultivation and in vitro development of *Leishmania orientalis*', *Parasitology Research*. *Parasitology Research*, 118(6), pp. 1885–1897. doi: 10.1007/s00436-019-06311-z.

- Chikweto, A. and Kumthekar, S., Chawla, P., Tiwari, K.P., Perea, L.M., Paterson, T. and Sharma, R. N. (2014) ‘Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in stray and pet dogs in Grenada, est Indies.’, *Tropical Biomedicine*, 31(2), pp. 347–350. Available at: [http://www.msptm.org/files/347\\_-\\_350\\_Chikweto\\_A.pdf](http://www.msptm.org/files/347_-_350_Chikweto_A.pdf).
- Conners, E. E. *et al.* (2016) ‘A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants Graphical abstract HHS Public Access’, *Acta Trop*, 156(Mc 0507), pp. 68–78. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.01.002.
- Cunningham, A. C. (2002) ‘Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*’, *Experimental and Molecular Pathology*, 72(2), pp. 132–141. doi: 10.1006/exmp.2002.2418.
- Dayakar, A. *et al.* (2019) ‘Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy’, *Frontiers in Immunology*, 10(APR). doi: 10.3389/fimmu.2019.00670.
- de Arruda, M. M. *et al.* (2016) ‘Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine *Leishmania* infection’, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(3), pp. 168–173. doi: 10.1590/0074-02760150364.
- de Freitas, E. O. *et al.* (2016) ‘The contribution of immune evasive mechanisms to parasite persistence in visceral Leishmaniasis’, *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2016.00153.
- De Marchi, C. R. *et al.* (2011) ‘Evaluation of a recombinant *Trypanosoma cruzi* mucin-like antigen for serodiagnosis of Chagas’ disease’, *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(11), pp. 1850–1855. doi: 10.1128/CVI.05289-11.
- De Oliveira, I. *et al.* (2015) ‘Multi-antigen print immunoassay (MAPIA)-based evaluation of novel recombinant *Leishmania infantum* antigens for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis’, *Parasites & Vectors*, 8(1), p. 45. doi: 10.1186/s13071-015-0651-6.
- De Souza, W. (1984) *Cell Biology of Trypanosoma cruzi*, *International Review of Cytology*. doi: 10.1016/S0074-7696(08)60180-1.
- Descoteaux, A. and Turco, S. J. (1999) ‘Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity’, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1455(2–3), pp. 341–352. doi: 10.1016/S0925-4439(99)00065-4.

- Dhom-Lemos, L. *et al.* (2019) ‘*Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis’, *PLoS ONE*, 14(1), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0211719.
- Díaz Lozano, I. M. *et al.* (2017) ‘Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(March), pp. 1–14. doi: 10.1038/srep44451.
- Dos Santos, J. I., Morgado, M. G. and Galvao-Castro, B. (1987) ‘Human visceral leishmaniasis: Analysis of the specificity of humoral immune response to polypeptides of *Leishmania donovani chagasi*’, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(2), pp. 263–270. doi: 10.4269/ajtmh.1987.37.263.
- dos Santos Sales, V. *et al.* (2018) ‘Antiparasitic activity and essential oil chemical analysis of the piper *Tuberculatum* Jacq fruit’, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17(1), pp. 268–275.
- Drugs for Neglected Diseases initiative - DNDi (2018). [https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2018/12/Factsheet2018\\_Chagas.pdf](https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2018/12/Factsheet2018_Chagas.pdf). Acessado em 08/07/2019.
- Ejazi, S. A. *et al.* (2018) ‘Immunoproteomic Identification and Characterization of *Leishmania* Membrane Proteins as Non-Invasive Diagnostic Candidates for Clinical Visceral Leishmaniasis’, *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-018-30546-y.
- Farahmand, M. and Nahrevanian, H. (2016) ‘Application of recombinant proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs’, *Iranian Biomedical Journal*, 20(3), pp. 128–134. doi: 10.7508/ibj.2016.03.001.
- Faria, A. R. *et al.* (2015) ‘Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1), pp. 13–16. doi: 10.1371/journal.pntd.0003429.
- Ferreira, A. W. *et al.* (2001) ‘Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas’ disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides.’, *Journal of clinical microbiology*, 39(12), pp. 4390–5. doi: 10.1128/JCM.39.12.4390-4395.2001.
- Flores-Chávez, M. *et al.* (2010) ‘Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en

- España’, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(5), pp. 284–293. doi: 10.1016/j.eimc.2009.07.005.
- Flores-Chavez, M. *et al.* (2012) ‘Sensitivity and Specificity of an Operon Immunochromatographic Test in Serum and Whole-Blood Samples for the Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection in Spain, an Area of Nonendemicity’, *Clini Vaccine Immunol*, 19, pp. 1353–1359. doi: 10.1128/CVI.00227-12.
  - Folgueira, C., Martínez-Bonet, M. and Requena, J. M. (2010) ‘The *Leishmania infantum* PUF proteins are targets of the humoral response during visceral leishmaniasis’, *BMC Research Notes*, 3. doi: 10.1186/1756-0500-3-13.
  - Fukutani, K. F. *et al.* (2014) ‘Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil’, *BMC Infectious Diseases*, 14(1), p. 422. doi: 10.1186/1471-2334-14-422.
  - Ghorbani, M. and Farhoudi, R. (2018) ‘Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy?’, *Drug Design, Development and Therapy*, 12, pp. 25–40. doi: 10.2147/DDDT.S146521.
  - Gupta, S. *et al.* (2013) ‘Antigenicity and Diagnostic Potential of Vaccine Candidates in Human Chagas Disease’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1). doi: 10.1371/journal.pntd.0002018.
  - Ibarra-Meneses, A. V. *et al.* (2019) ‘Prevalence of asymptomatic leishmania infection and associated risk factors, after an outbreak in the Southwestern Madrid Region, Spain, 2015’, *Eurosurveillance*, 24(22). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.22.1800379.
  - Ker, H. G. *et al.* (2013) ‘Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis’, *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(12), pp. 1792–1798. doi: 10.1128/CVI.00575-13.
  - Lewis, M. D. *et al.* (2018) ‘Imaging the development of chronic Chagas disease after oral transmission’, *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/s41598-018-29564-7.
  - Llano, M. *et al.* (2014) ‘Evaluación preliminar de la prueba comercial Chagas (*Trypanosoma cruzi*) IgG-ELISA ® en individuos colombianos’, *Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 34, pp. 228–236. doi: 10.7705/biomedica.v34i2.1580.

- Lidani, K. C. F. *et al.* (2019) ‘Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem’, *Frontiers in Public Health*, 7(July), pp. 1–13. doi: 10.3389/fpubh.2019.00166.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* V. 193, 265-275.
- Malchiodi E. L. *et al.* (1994) ‘Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6)’, *Clin Exp Immunol*, 97, pp. 417–423.
- Marchese, L. *et al.* (2018) ‘The Uptake and Metabolism of Amino Acids, and Their Unique Role in the Biology of Pathogenic Trypanosomatids’, *Pathogens*, 7(2), p. 36. doi: 10.3390/pathogens7020036.
- Martins, V. T. *et al.* (2015) ‘A *Leishmania*-specific hypothetical protein expressed in both promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* employed for the serodiagnosis of, and as a vaccine candidate against, visceral leishmaniasis’, *Parasites and Vectors*. Parasites & Vectors, 8(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s13071-015-0964-5.
- Mendicino, D. *et al.* (2014) ‘Diagnostic reliability of an immunochromatographic test for chagas disease screening at a primary health care centre in a rural endemic area’, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(8), pp. 984–988. doi: 10.1590/0074-0276140153.
- Messenger, L. A., Miles, M. A. and Bern, C. (2015) ‘Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease’, *Expert Review of Anti-infective Therapy*. Informa UK, Ltd., 13(8), pp. 995–1029. doi: 10.1586/14787210.2015.1056158.
- Morais CGV, Lima AKC, Terra R, Santos RFS, Silva SAG, D. P. (2015) ‘The Dialogue of the Host-Parasite Relationship-’, *BioMed Research International*, pp. 1–19.
- Mucci, J. *et al.* (2017) ‘Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(10), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pntd.0005972.

- Nakazawa, M. *et al.* (2001) ‘Excretory-Secretory Antigens of *Trypanosoma cruzi* Are Potentially Useful for Serodiagnosis of Chronic Chagas’ Disease’, *Clinical and Vaccine Immunology*, 8(5), pp. 1024–1027. doi: 10.1128/cdli.8.5.1024-1027.2001.
- Oliveira, V. V. G. de, Alves, L. C. and Silva Junior, V. A. da (2015) ‘Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals’, *Ciência Rural*, 45(9), pp. 1622–1628. doi: 10.1590/0103-8478cr20141368.
- PAHO (2022) *Chagas Disease*, Pan American Health Organization.
- PAHO (2022) *Leishmaniasis*, Pan American Health Organization.
- Pech-canul, Á. D. C., Monteón, V. and Biom, I. (2017) ‘A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*’, *Journal of Parasitology Research*, 2017. doi: 10.1155/2017/3751403.
- Pérez-Molina JA, Molina I. Seminar Chagas disease. *Lancet* [Internet]. 2018; 391:82–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>
- Perrone, A. E. *et al.* (2018) ‘A Functional Analysis of the Cyclophilin Repertoire in the Protozoan Parasite *Trypanosoma Cruzi*’, *Biomolecules*, 8(132), pp. 1–9. doi: 10.3390/biom8040132.
- Porcino, G. N. *et al.* (2019) ‘Evaluation of methods for detection of asymptomatic individuals infected with *Leishmania infantum* in the state of Piauí, Brazil’, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(7), p. e0007493. doi: 10.1371/journal.pntd.0007493.
- Reed, S. G. *et al.* (2016) ‘Leishmania Vaccine Development: Exploiting the Host-Vector-Parasite Interface’, *Expert Rev Vaccines.*, 15(1), pp. 81–90. doi:10.1586/14760584.2016.1105135.
- Reis-Cunha, J. L. *et al.* (2014) ‘Genome-wide screening and identification of new *Trypanosoma cruzi* antigens with potential application for chronic chagas disease diagnosis’, *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0106304.
- Riera, C. *et al.* (2012) ‘Short report: Identification of a western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera’, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0111.
- Rodrigues, A. S. *et al.* (2014) ‘Padronização do Elisa indireto e Western Blot para diagnóstico da artrite-encefalite caprina’, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(2), pp. 417–424. doi: 10.1590/1678-41626303.

- Roman, F. *et al.* (2018) ‘Dissecting the phyloepidemiology of *Trypanosoma cruzi* I (TcI) in Brazil by the use of high resolution genetic markers’, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, pp. 1–28.
- Saba, E. S. *et al.* (2013) ‘Anti-*Trypanosoma cruzi* Cross-Reactive Antibodies Detected at High Rate in Non-Exposed Individuals Living in Non-Endemic Regions: Seroprevalence and Association to Other Viral Serologies’, *PLoS ONE*, 8(9), pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0074493.
- Santos, A. R. R. Dos *et al.* (2019) ‘Evaluation of three recombinant proteins for the development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis serodiagnosis’, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 114, p. e180405. doi: 10.1590/0074-02760180405.
- Santos, F. L. N. *et al.* (2016a) ‘Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests’, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), pp. 1034–1039. doi: 10.4269/ajtmh.15-0820.
- Santos, F. L. N. *et al.* (2016b) ‘Performance assessment of four chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens based on antigen-antibody detection for diagnosis of chronic chagas disease’, *PLoS ONE*, 11(8), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0161100.
- Santos, F. L. N. *et al.* (2017) ‘Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease – a Phase II study’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pntd.0005433.
- Santos-Gomes, G. M. and Abranches, P. (1996) ‘Comparative study of infectivity caused by promastigotes of *Leishmania infantum* MON-1, *L. infantum* MON-24 and *L. donovani* MON-18’, *Folia Parasitologica*, pp. 7–12.
- Santos, L. D. S. *et al.* (2012) ‘In-house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity’, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(1), pp. 35–44. doi: 10.1590/S0037-86822012000100008.
- Shah, V. *et al.* (2014) ‘Field evaluation of the In Bios Chagas detect plus rapid test in serum and whole-blood specimens in Bolivia’, *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(12), pp. 1645–1649. doi: 10.1128/CVI.00609-14.

- Singh, O. P. and Sundar, S. (2015) ‘Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era’, *Journal of Parasitology Research*. Hindawi Publishing Corporation, 2015, pp. 1–10. doi: 10.1155/2015/239469.
- Slavov, S. N. *et al.* (2017) ‘Prevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies in blood donors from the São Paulo state, Brazil, between 2012 and 2014’, *Journal of Infection in Developing Countries*, 11(3), pp. 277–281. doi: 10.3855/jidc.8169.
- Smith, P. K. *et al.* (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. V. 150, 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Silva, L. H. P. and Nussenzweig, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20, 191-203.
- Souza Filho, J. A. de *et al.* (2016) ‘Performance of Alere™ immunochromatographic test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis’, *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 225, pp. 114–116. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.06.011.
- Souza, W. (2002) ‘Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*’, *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), pp. 269–285. doi: 10.2174/1381612023396276.
- Teixeira-Carvalho, A. *et al.* (2015) ‘FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: A multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis’, *PLoS ONE*, 10(4), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0122938.
- Teles, J. A. A. *et al.* (2012) ‘Standardization and evaluation of an indirect ELISA for the serological diagnosis of glanders in horses’, *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 32(9), pp. 838–842. doi: 10.1590/S0100-736X2012000900004.
- Torres-Guerrero, E. *et al.* (2017) ‘Leishmaniasis: a review’, *F1000 Research*, 6(May), p. 750. doi: 10.12688/f1000research.11120.1.
- Vallur, A. C. *et al.* (2015) ‘Development and comparative evaluation of two antigen detection tests for Visceral Leishmaniasis’, *BMC Infectious Diseases*. BMC Infectious Diseases, 15(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12879-015-1125-3.
- Vega Benedetti, A. F. *et al.* (2013) ‘Performance of different *Trypanosoma cruzi* antigens in the diagnosis of Chagas disease in patients with American cutaneous leishmaniasis from a co-endemic region in Argentina’, *Tropical Medicine and International Health*, 18(9), pp. 1103–1109. doi: 10.1111/tmi.12144.
- Vexenat AC, Santana JM, T. A. (1996) ‘Cross-reactivity of antibodies in human infectious by the Kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and

- Leishmania (Viannia) braziliensis.*’, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 38(3), pp. 177–185.
- Voller, A., Bidwell, D. E. and Bartlett, A. (1976) ‘Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice’, *Bulletin of the World Health Organization*, 53(1), pp. 55–65.
  - WHO (2018) *Epidemiological situation visceral leishmaniasis*, World Health Organization.
  - Zaia, D. A. M., Zaia, C. T. B. V. and Lichtig, J. (1998) ‘Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes’, *Quimica Nova*, 21(6), pp. 787–793. doi: 10.1590/S0100-40421998000600020.
  - Zingales, B. *et al.* (2009) ‘A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI’, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), pp. 1051–1054. doi: 10.1590/S0074-02762009000700021.
  - Zingales, B. *et al.* (2012) ‘Infection, Genetics and Evolution The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications’, *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V., 12(2), pp. 240–253. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.009.
  - Zingales, B. (2018) ‘*Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity’, *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 184, pp. 38–52. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.017.



# **Anexos**

**ANEXO I: Soluções e reagentes utilizados em ELISA**

**ANEXO II: Soluções, tampões e corantes utilizados em *Immunoblotting***

**ANEXO III: Tabelas com densidades óticas das amostras analisadas em ELISA**



## ANEXO I

**Soluções e tampões utilizados em ELISA:**

Tampão Bicarbonato - 0,1 M pH 8,5		
Componente	Fórmula Química	Quantidade
Bicarbonato de sódio	NaHCO <sub>3</sub>	0,84 g
Água	H <sub>2</sub> O	80,00 mL
Ajustar pH para 8.5 com Ácido Clorídrico ou Fosfato de Sódio		
	HCl / NaOH	
Água	H <sub>2</sub> O	100,00 mL

Tampão Citrato - 0,1 M pH 5.0		
Componente	Fórmula Química	Quantidade
Ácido cítrico 0.1 M	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,47 g
Fosfato de sódio dibásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,36 g
Água	H <sub>2</sub> O	80,00 mL
Ajustar pH para 5.0 com Ácido Clorídrico ou Fosfato de Sódio		
	HCl / NaOH	
Água	H <sub>2</sub> O	100,00 mL

Tampão Fosfato-salino		
Phosphate Buffered Saline - PBS (10X)		
Componente	Fórmula Química	Quantidade
Cloreto de sódio	NaCl	80,00 g
Cloreto de potássio	KCl	2,00 g
Fosfato de sódio dibásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,40 g
Fosfato de potássio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,40 g
Água	H <sub>2</sub> O	800,00 mL
Ajustar pH para 7.4 com Ácido Clorídrico ou Fosfato de Sódio		
	HCl / NaOH	
Água	H <sub>2</sub> O	p 1L

Tampão Fosfato-salino (1X)	
Phosphate Buffered Saline - PBS (1x)	
Componente	Quantidade
PBS 10 X	100 mL
H <sub>2</sub> O	900 mL

**Tampão de Lavagem  
(PBS 1X / Twenn 20 0,05%)**

Componente	Quantidade
PBS 1 X	500 mL
Twenn 20	250 $\mu$ L

**Solução de Substrato para HRP**

Componente	Fórmula Química	Quantidade
Tampão citrato 0,1M pH 5,0		10 mL
Peróxido de hidrogênio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 $\mu$ L
Pastilha OPD		1

**Solução de Parada (STOP) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N**

Componente	Fórmula Química	Quantidade
Ácido sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	106 mL
Peróxido de hidrogênio	H <sub>2</sub> O	394 mL

[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] = 100% = 98,08 (no rótulo do frasco)

## ANEXO II

**Soluções, tampões e corantes utilizados em *Immunoblotting*:**

Solução de Dodecil Sulfato de Sódio 10X (SDS 10X)	
Componente	Quantidade
250 M Tris	30,0 g
1,92 M Glicina	144,0 g
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	10,0 g
Metanol	600,0 mL
H <sub>2</sub> O	qsp 1000,0 mL

Armazenamento: Temperatura ambiente

Solução de Dodecil Sulfato de Sódio 1X (SDS 1X)	
Componente	Quantidade
SDS 10 X	100,0 mL
H <sub>2</sub> O	900,0 mL

Armazenamento: Temperatura ambiente

Solução de Dodecil Sulfato de Sódio 20% (SDS 20%)	
Componente	Quantidade
SDS	20,0 g
H <sub>2</sub> O	qsp 100,0 mL

Armazenamento: Temperatura ambiente

Solução de Dodecil Sulfato de Sódio 10% (SDS 10%)	
Componente	Quantidade
SDS	10,0 g
H <sub>2</sub> O	qsp 100,0 mL

Armazenamento: Temperatura ambiente

Solução de 30% de acrilamida (para 100 mL)	
Componente	Quantidade
Acrilamida	30,0 g
Bis-acrilamida	0,8 g
H <sub>2</sub> O	100,0 mL

Armazenamento: 5° C

Solução de 30% de Persulfato de Amônia (APS 30%)	
Componente	Quantidade
Persulfato de Amônia (APS)	300,0 mg
H <sub>2</sub> O	1,0 mL

Armazenamento: -20 ° C

Tris-HCl 1.5M pH 8.8	
Componente	Quantidade
Tris (hidroximetil) aminometano	18,17 g
SDS 20 %	2,00 mL
H <sub>2</sub> O	100,00 mL

Adicionar 50 mL de água ao Trizma e ajustar o pH para 8.8

Acrescentar o SDS

Completar o volume e filtrar a solução

Armazenamento: 5° C

Tris-HCl 0.5M pH 6.8 (Tampão do gel de empilhamento)	
Componente	Quantidade
Tris (hidroximetil) aminometano	6,06 g
SDS 20 %	2,00 mL
H <sub>2</sub> O	100,00 mL

Adicionar 50 mL de água ao Trizma e ajustar o pH para 6.8

Acrescentar o SDS

Completar o volume e filtrar a solução

Armazenamento: 5° C

Tampão de amostra: Sample Buffer 2X (SDS Reducing Buffer)	
Componente	Quantidade
Azul de bromofenol 0,5%	0,20 mL (m/v)
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	1,25 mL
Glicerol	2,50 mL
SDS 10%	2,00 mL (m/v)
H <sub>2</sub> O	3,55 mL

Volume final da solução: 9,5 mL  
 Pode-se alíquotar o tampão sem o beta-mercaptoetanol, para só acrescentá-lo no momento em que for utilizar o tampão.  
 Diluir na seguinte proporção:  
 950 µL de Sample Buffer + 50 µL de beta-mercaptoetanol, ou,  
 475 µL de tampão de amostra alíquotada + 25 µL de beta-mercaptoetanol

---

Armazenamento: 4 °C

Tampão de Corrida (10 X)	
Componente	Quantidade
Tris base	30,3 g
Glicina	144,1 g
SDS	10,0 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1000,0 mL

Armazenamento: 4 °C

Tampão de Corrida (1 X)	
Componente	Quantidade
Tampão de corrida (10 X)	100,0 mL
H <sub>2</sub> O	900,0 mL

Tampão de Transferência) (1X)	
Componente	Quantidade
Tris base	3,0 g
Glicina	14,4 g
Metanol	200,0 mL
H <sub>2</sub> O	qsp 1000,0 mL

Armazenamento: 4 °C

Corante para gel de poliacrilamida com Comassie Blue (para 1 L)	
Componente	Quantidade
Ácido acético	100,0 mL
Comassie Blue G-250	5,0 mL
Metanol	300,0 mL
H <sub>2</sub> O	595,0 mL

Armazenamento: Temperatura ambiente (frasco âmbar)

Solução descorante (para 1 L)	
Componente	Quantidade
Ácido acético	50,0 mL
Metanol	100,0 mL
H <sub>2</sub> O	850,0 mL

Armazenamento: Temperatura ambiente (frasco âmbar)

## ANEXO III

Tabelas com densidades óticas dos soros analisados em ELISA:

**Tabela 1. Caracterização serológica de IgG total anti-*Trypanosoma cruzi* em indivíduos com doença de Chagas (n=240), diluição 1:200.**

Amostra	Diluição				Média	Média	Cut off	1:200 / Cut off
	1:100	1:200	1:400	1:800	HRP	Branco		
1	1,718	0,526	0,355	0,220	0,055	0,044	0,500	1,052
2	3,320	2,099	1,564	1,067	0,055	0,044	0,500	4,198
3	2,848	1,822	1,726	0,965	0,055	0,044	0,500	3,644
4	2,176	0,776	0,550	0,320	0,055	0,044	0,500	1,552
5	3,103	1,442	1,097	0,601	0,055	0,044	0,500	2,884
6	1,878	0,569	0,359	0,224	0,055	0,044	0,500	1,138
7	2,208	1,089	0,740	0,410	0,055	0,044	0,500	2,178
8	1,470	0,654	0,512	0,284	0,055	0,044	0,500	1,308
9	1,676	0,865	0,652	0,378	0,055	0,044	0,500	1,730
10	2,182	0,951	0,728	0,399	0,055	0,044	0,500	1,902
11	2,650	1,280	1,011	0,565	0,055	0,044	0,500	2,560
12	2,061	0,947	0,576	0,328	0,055	0,044	0,500	1,894
13	1,351	0,414	0,249	0,149	0,055	0,044	0,500	0,828
14	1,078	0,401	0,306	0,184	0,055	0,044	0,500	0,802
15	2,542	0,961	0,626	0,377	0,055	0,044	0,500	1,922
16	1,837	0,556	0,334	0,184	0,055	0,044	0,500	1,112
17	1,019	0,306	0,184	0,107	0,055	0,044	0,500	0,612
18	2,058	1,215	0,869	0,536	0,055	0,044	0,500	2,430
19	2,458	1,647	1,126	0,714	0,055	0,044	0,500	3,294
20	1,912	0,929	0,747	0,384	0,055	0,044	0,500	1,858
21	0,768	0,307	0,181	0,125	0,055	0,044	0,500	0,614
22	1,843	0,803	0,463	0,280	0,055	0,044	0,500	1,606
23	1,528	0,664	0,325	0,182	0,044	0,054	0,500	1,328
24	1,047	0,363	0,214	0,155	0,044	0,054	0,500	0,726
25	1,446	0,754	0,323	0,197	0,044	0,054	0,500	1,508
26	0,803	0,318	0,196	0,125	0,044	0,054	0,500	0,636
27	1,153	0,444	0,265	0,197	0,044	0,054	0,500	0,888
28	0,673	0,394	0,235	0,177	0,044	0,054	0,500	0,788
29	1,063	0,459	0,274	0,175	0,044	0,054	0,500	0,918
30	0,718	0,418	0,224	0,138	0,044	0,054	0,500	0,836
31	1,470	0,924	0,605	0,502	0,044	0,054	0,500	1,848
32	1,083	0,613	0,357	0,191	0,044	0,054	0,500	1,226
33	1,207	0,793	0,452	0,245	0,044	0,054	0,500	1,586

34	0,799	0,376	0,265	0,181	0,044	0,054	0,500	0,752
35	1,859	1,140	0,941	0,659	0,044	0,054	0,500	2,280
36	1,127	0,494	0,295	0,195	0,044	0,054	0,500	0,988
37	1,133	0,406	0,283	0,194	0,044	0,054	0,500	0,812
38	0,696	0,325	0,192	0,131	0,044	0,054	0,500	0,650
39	0,704	0,313	0,194	0,132	0,044	0,054	0,500	0,626
40	1,671	0,774	0,528	0,322	0,044	0,054	0,500	1,548
41	1,634	0,883	0,602	0,368	0,044	0,054	0,500	1,766
42	0,993	0,421	0,256	0,144	0,044	0,054	0,500	0,842
43	0,779	0,646	0,414	0,276	0,044	0,054	0,500	1,292
44	0,962	0,420	0,281	0,168	0,044	0,054	0,500	0,840
45	1,252	0,615	0,371	0,280	0,043	0,043	0,500	1,230
46	0,755	0,294	0,162	0,113	0,043	0,043	0,500	0,588
47	1,374	0,748	0,387	0,256	0,043	0,043	0,500	1,496
48	1,421	0,727	0,363	0,284	0,043	0,043	0,500	1,454
49	1,059	0,491	0,244	0,158	0,043	0,043	0,500	0,982
50	1,657	0,631	0,280	0,189	0,043	0,043	0,500	1,262
51	1,732	0,775	0,359	0,255	0,043	0,043	0,500	1,550
52	0,563	0,239	0,142	0,107	0,043	0,043	0,500	0,478
53	1,567	0,767	0,413	0,249	0,043	0,043	0,500	1,534
54	1,063	0,369	0,203	0,128	0,043	0,043	0,500	0,738
55	1,095	0,436	0,235	0,150	0,043	0,043	0,500	0,872
56	1,330	0,660	0,458	0,286	0,043	0,043	0,500	1,320
57	1,046	0,464	0,305	0,197	0,043	0,043	0,500	0,928
58	1,309	0,504	0,311	0,191	0,043	0,043	0,500	1,008
59	1,482	0,825	0,534	0,319	0,043	0,043	0,500	1,650
60	1,595	0,574	0,298	0,211	0,043	0,043	0,500	1,148
61	0,859	0,329	0,221	0,141	0,043	0,043	0,500	0,658
62	0,773	0,347	0,214	0,141	0,043	0,043	0,500	0,694
63	0,890	0,400	0,269	0,162	0,043	0,043	0,500	0,800
64	1,621	0,777	0,491	0,276	0,043	0,043	0,500	1,554
65	0,575	0,226	0,146	0,100	0,043	0,043	0,500	0,452
66	0,614	0,439	0,274	0,172	0,043	0,043	0,500	0,878
67	3,591	2,925	2,220	1,332	0,064	0,056	0,500	5,850
68	3,789	3,087	2,936	2,168	0,064	0,056	0,500	6,174
69	1,307	0,453	0,332	0,180	0,064	0,056	0,500	0,906
70	2,478	0,855	0,598	0,308	0,064	0,056	0,500	1,710
71	1,772	0,688	0,476	0,266	0,064	0,056	0,500	1,376
72	2,654	1,148	0,692	0,376	0,064	0,056	0,500	2,296
73	0,882	0,317	0,215	0,140	0,064	0,056	0,500	0,634
74	2,375	1,189	0,806	0,467	0,064	0,056	0,500	2,378
75	2,645	1,880	1,643	1,055	0,064	0,056	0,500	3,760
76	1,570	0,672	0,421	0,228	0,064	0,056	0,500	1,344

77	2,611	1,361	0,956	0,471	0,064	0,056	0,500	2,722
78	1,921	0,786	0,492	0,332	0,064	0,056	0,500	1,572
79	2,421	1,147	0,721	0,436	0,064	0,056	0,500	2,294
80	2,474	1,122	0,737	0,432	0,064	0,056	0,500	2,244
81	2,067	1,119	0,762	0,447	0,064	0,056	0,500	2,238
82	3,472	2,176	1,287	0,722	0,064	0,056	0,500	4,352
83	3,116	1,456	1,030	0,571	0,064	0,056	0,500	2,912
84	1,114	0,400	0,244	0,160	0,064	0,056	0,500	0,800
85	2,247	1,013	0,605	0,362	0,064	0,056	0,500	2,026
86	2,713	1,668	1,006	0,674	0,064	0,056	0,500	3,336
87	3,603	2,182	1,346	0,848	0,064	0,056	0,500	4,364
88	2,225	1,263	0,729	0,481	0,064	0,056	0,500	2,526
89	1,420	0,678	0,441	0,258	0,067	0,059	0,500	1,356
90	1,614	0,876	0,589	0,368	0,067	0,059	0,500	1,752
91	0,873	0,330	0,231	0,158	0,067	0,059	0,500	0,660
92	0,560	0,223	0,149	0,111	0,067	0,059	0,500	0,446
93	0,663	0,257	0,175	0,135	0,067	0,059	0,500	0,514
94	1,231	0,484	0,276	0,178	0,067	0,059	0,500	0,968
95	0,817	0,309	0,172	0,095	0,067	0,059	0,500	0,618
96	0,904	0,391	0,270	0,129	0,067	0,059	0,500	0,782
97	1,179	0,721	0,482	0,208	0,067	0,059	0,500	1,442
98	1,692	1,136	0,838	0,526	0,067	0,059	0,500	2,272
99	0,860	0,397	0,245	0,167	0,067	0,059	0,500	0,794
100	0,850	0,403	0,256	0,180	0,067	0,059	0,500	0,806
101	0,760	0,215	0,133	0,123	0,067	0,059	0,500	0,430
102	0,957	0,415	0,269	0,180	0,067	0,059	0,500	0,830
103	1,361	0,920	0,616	0,338	0,067	0,059	0,500	1,840
104	1,217	0,366	0,229	0,161	0,067	0,059	0,500	0,732
105	1,550	1,134	0,842	0,579	0,067	0,059	0,500	2,268
106	1,385	0,697	0,456	0,254	0,067	0,059	0,500	1,394
107	0,913	0,346	0,208	0,139	0,067	0,059	0,500	0,692
108	1,546	0,763	0,456	0,212	0,067	0,059	0,500	1,526
109	1,037	0,816	0,577	0,362	0,067	0,059	0,500	1,632
110	0,362	0,187	0,129	0,095	0,067	0,059	0,500	0,374
111	2,178	1,748	1,349	1,327	0,045	0,044	0,500	3,496
112	1,782	1,301	1,043	0,920	0,045	0,044	0,500	2,602
113	1,500	1,187	0,945	0,936	0,045	0,044	0,500	2,374
114	1,775	1,371	1,352	1,142	0,045	0,044	0,500	2,742
115	1,577	1,259	1,142	1,076	0,045	0,044	0,500	2,518
116	1,303	1,144	1,001	0,834	0,045	0,044	0,500	2,288
117	1,875	1,203	1,052	0,924	0,045	0,044	0,500	2,406
118	1,499	1,230	1,180	0,998	0,045	0,044	0,500	2,460
119	1,765	1,281	1,329	1,065	0,045	0,044	0,500	2,562

120	1,439	1,160	0,958	0,911	0,045	0,044	0,500	2,320
121	1,220	0,625	0,549	0,639	0,045	0,044	0,500	1,250
122	1,479	0,998	0,885	0,919	0,045	0,044	0,500	1,996
123	1,435	1,075	0,984	0,943	0,045	0,044	0,500	2,150
124	1,610	1,153	1,000	0,943	0,045	0,044	0,500	2,306
125	1,683	1,282	0,984	0,926	0,045	0,044	0,500	2,564
126	1,499	1,070	0,920	0,893	0,045	0,044	0,500	2,140
127	1,309	0,829	0,892	0,828	0,045	0,044	0,500	1,658
128	1,229	0,878	0,915	0,954	0,045	0,044	0,500	1,756
129	1,683	1,175	0,993	0,977	0,045	0,044	0,500	2,350
130	1,472	1,059	0,948	0,829	0,045	0,044	0,500	2,118
131	1,959	1,759	1,647	1,427	0,045	0,044	0,500	3,518
132	1,442	1,314	1,257	1,009	0,045	0,044	0,500	2,628
133	2,351	2,075	1,228	0,900	0,051	0,050	0,500	4,150
134	1,293	0,541	0,309	0,131	0,051	0,050	0,500	1,082
135	3,354	1,121	0,663	0,254	0,051	0,050	0,500	2,242
136	1,422	0,617	0,331	0,163	0,051	0,050	0,500	1,234
137	1,652	0,610	0,338	0,166	0,051	0,050	0,500	1,220
138	1,212	0,698	0,367	0,209	0,051	0,050	0,500	1,396
139	2,083	0,808	0,467	0,172	0,051	0,050	0,500	1,616
140	1,293	0,438	0,324	0,212	0,051	0,050	0,500	0,876
141	1,420	0,540	0,386	0,222	0,051	0,050	0,500	1,080
142	1,276	0,314	0,173	0,117	0,051	0,050	0,500	0,628
143	1,733	0,705	0,377	0,220	0,051	0,050	0,500	1,410
144	2,402	1,114	0,847	0,406	0,051	0,050	0,500	2,228
145	1,687	0,766	0,507	0,343	0,051	0,050	0,500	1,532
146	1,460	0,410	0,159	0,039	0,051	0,050	0,500	0,820
147	2,420	1,236	0,910	0,675	0,051	0,050	0,500	2,472
148	1,418	0,582	0,287	0,139	0,051	0,050	0,500	1,164
149	1,309	0,419	0,172	0,053	0,051	0,050	0,500	0,838
150	1,094	0,358	0,148	0,048	0,051	0,050	0,500	0,716
151	1,545	0,664	0,318	0,204	0,051	0,050	0,500	1,328
152	1,273	0,647	0,391	0,199	0,051	0,050	0,500	1,294
153	1,470	0,681	0,420	0,214	0,051	0,050	0,500	1,362
154	1,896	1,288	0,776	0,497	0,051	0,050	0,500	2,576
155	1,374	0,400	0,181	0,074	0,073	0,072	0,500	0,800
156	2,070	0,790	0,489	0,438	0,073	0,072	0,500	1,580
157	0,776	0,248	0,096	0,030	0,073	0,072	0,500	0,496
158	1,698	0,659	0,382	0,148	0,073	0,072	0,500	1,318
159	1,856	0,792	0,362	0,150	0,073	0,072	0,500	1,584
160	1,040	0,475	0,158	0,028	0,073	0,072	0,500	0,950
161	2,487	1,718	1,099	0,596	0,073	0,072	0,500	3,436
162	1,342	0,744	0,448	0,151	0,073	0,072	0,500	1,488

163	1,416	0,728	0,406	0,145	0,073	0,072	0,500	1,456
164	1,863	0,946	0,509	0,407	0,073	0,072	0,500	1,892
165	3,014	2,447	2,296	1,732	0,073	0,072	0,500	4,894
166	2,284	1,401	0,944	0,553	0,073	0,072	0,500	2,802
167	2,089	0,871	0,538	0,258	0,073	0,072	0,500	1,742
168	2,086	0,800	0,540	0,334	0,073	0,072	0,500	1,600
169	1,120	0,442	0,284	0,128	0,073	0,072	0,500	0,884
170	2,384	1,664	1,525	0,971	0,073	0,072	0,500	3,328
171	1,085	0,387	0,150	0,061	0,073	0,072	0,500	0,774
172	1,957	0,948	0,615	0,315	0,073	0,072	0,500	1,896
173	0,864	0,297	0,129	0,077	0,073	0,072	0,500	0,594
174	1,517	0,730	0,210	0,223	0,073	0,072	0,500	1,460
175	1,234	0,750	0,390	0,184	0,073	0,072	0,500	1,500
176	0,775	0,312	0,177	0,088	0,073	0,072	0,500	0,624
177	1,013	1,076	0,669	0,411	0,065	0,067	0,500	2,152
178	0,193	0,204	0,132	0,095	0,065	0,067	0,500	0,408
179	1,695	0,766	0,453	0,309	0,065	0,067	0,500	1,532
180	2,351	1,036	0,727	0,460	0,065	0,067	0,500	2,072
181	1,795	0,832	0,448	0,246	0,065	0,067	0,500	1,664
182	1,966	1,522	0,871	0,596	0,065	0,067	0,500	3,044
183	1,706	0,710	0,420	0,238	0,065	0,067	0,500	1,420
184	2,471	1,000	0,615	0,384	0,065	0,067	0,500	2,000
185	2,107	0,876	0,475	0,278	0,065	0,067	0,500	1,752
186	2,810	1,765	1,132	0,675	0,065	0,067	0,500	3,530
187	2,536	1,223	0,767	0,442	0,065	0,067	0,500	2,446
188	2,459	1,654	1,095	0,635	0,065	0,067	0,500	3,308
189	1,641	1,172	0,549	0,305	0,065	0,067	0,500	2,344
190	1,485	1,218	0,823	0,301	0,065	0,067	0,500	2,436
191	1,328	0,922	0,596	0,384	0,065	0,067	0,500	1,844
192	2,536	1,871	1,289	0,943	0,065	0,067	0,500	3,742
193	2,151	0,756	0,432	0,308	0,065	0,067	0,500	1,512
194	1,830	1,113	0,655	0,395	0,065	0,067	0,500	2,226
195	1,657	0,826	0,503	0,366	0,065	0,067	0,500	1,652
196	0,964	0,254	0,136	0,103	0,065	0,067	0,500	0,508
197	0,298	0,285	0,293	0,319	0,065	0,067	0,500	0,570
198	0,813	0,318	0,179	0,126	0,065	0,067	0,500	0,636
199	1,591	0,562	0,401	0,264	0,048	0,050	0,500	1,124
200	1,004	0,353	0,223	0,156	0,048	0,050	0,500	0,706
201	0,863	0,296	0,167	0,113	0,048	0,050	0,500	0,592
202	1,283	0,745	0,521	0,334	0,048	0,050	0,500	1,490
203	1,140	0,580	0,340	0,243	0,048	0,050	0,500	1,160
204	1,043	0,518	0,306	0,189	0,048	0,050	0,500	1,036
205	0,752	0,236	0,143	0,092	0,048	0,050	0,500	0,472

206	0,931	0,419	0,262	0,157	0,048	0,050	0,500	0,838
207	0,912	0,447	0,273	0,164	0,048	0,050	0,500	0,894
208	0,800	0,407	0,279	0,191	0,048	0,050	0,500	0,814
209	0,942	0,296	0,164	0,103	0,048	0,050	0,500	0,592
210	0,550	0,219	0,135	0,095	0,048	0,050	0,500	0,438
211	0,920	0,444	0,268	0,176	0,048	0,050	0,500	0,888
212	1,038	0,667	0,332	0,200	0,048	0,050	0,500	1,334
213	1,587	1,380	1,049	0,758	0,048	0,050	0,500	2,760
214	1,635	1,293	0,825	0,530	0,048	0,050	0,500	2,586
215	0,628	0,276	0,165	0,103	0,048	0,050	0,500	0,552
216	0,880	0,446	0,254	0,150	0,048	0,050	0,500	0,892
217	0,726	0,368	0,216	0,133	0,048	0,050	0,500	0,736
218	1,014	0,458	0,249	0,164	0,048	0,050	0,500	0,916
219	1,049	0,668	0,390	0,247	0,048	0,050	0,500	1,336
220	0,829	0,500	0,311	0,191	0,048	0,050	0,500	1,000
221	2,239	1,629	1,262	1,019	0,080	0,048	0,500	3,258
222	1,601	1,100	0,710	0,467	0,080	0,048	0,500	2,200
223	0,942	0,413	0,290	0,231	0,080	0,048	0,500	0,826
224	1,446	0,484	0,384	0,299	0,080	0,048	0,500	0,968
225	0,761	0,308	0,259	0,214	0,080	0,048	0,500	0,616
226	0,738	0,307	0,236	0,221	0,080	0,048	0,500	0,614
227	0,632	0,336	0,237	0,178	0,080	0,048	0,500	0,672
228	0,690	0,422	0,282	0,207	0,080	0,048	0,500	0,844
229	0,698	0,354	0,373	0,199	0,080	0,048	0,500	0,708
230	1,681	0,532	0,301	0,497	0,080	0,048	0,500	1,064
231	0,281	0,126	0,161	0,308	0,080	0,048	0,500	0,252
232	0,897	0,646	0,890	1,380	0,080	0,048	0,500	1,292
233	1,444	0,928	0,665	0,466	0,080	0,048	0,500	1,856
234	0,521	0,323	0,328	0,897	0,080	0,048	0,500	0,646
235	0,602	0,337	0,378	0,985	0,080	0,048	0,500	0,674
236	1,245	0,679	0,968	1,299	0,080	0,048	0,500	1,358
237	0,716	0,498	0,660	0,495	0,080	0,048	0,500	0,996
238	0,795	0,632	0,586	0,761	0,080	0,048	0,500	1,264
239	0,405	0,389	0,574	1,158	0,080	0,048	0,500	0,778
240	1,219	0,739	1,187	0,551	0,080	0,048	0,500	1,478

**Tabela 2. Caracterização serológica de IgG total anti-*Leishmania infantum* em indivíduos com Leishmaniose Visceral (n=240), diluição 1:200.**

Amostra	Diluição				Média	Média	Cut off	1:200 / Cut off
	1:100	1:200	1:400	1:800	HRP	Branco		
1	0,744	0,352	0,225	0,118	0,046	0,045	0,500	1,488
2	1,206	1,041	0,713	0,439	0,046	0,045	0,500	2,412
3	0,871	1,004	0,847	0,611	0,046	0,045	0,500	1,742
4	0,595	0,454	0,282	0,175	0,046	0,045	0,500	1,190
5	1,424	0,791	0,577	0,375	0,046	0,045	0,500	2,848
6	0,857	0,330	0,167	0,093	0,046	0,045	0,500	1,714
7	0,996	0,485	0,303	0,170	0,046	0,045	0,500	1,992
8	0,642	0,300	0,176	0,108	0,046	0,045	0,500	1,284
9	0,758	0,404	0,259	0,148	0,046	0,045	0,500	1,516
10	0,604	0,294	0,185	0,118	0,046	0,045	0,500	1,208
11	1,134	0,564	0,337	0,184	0,046	0,045	0,500	2,268
12	0,669	0,419	0,233	0,134	0,046	0,045	0,500	1,338
13	0,482	0,187	0,116	0,072	0,046	0,045	0,500	0,964
14	0,187	0,136	0,089	0,061	0,046	0,045	0,500	0,374
15	0,789	0,518	0,323	0,184	0,046	0,045	0,500	1,578
16	0,598	0,281	0,180	0,110	0,046	0,045	0,500	1,196
17	0,242	0,160	0,112	0,076	0,046	0,045	0,500	0,484
18	0,877	0,557	0,367	0,213	0,046	0,045	0,500	1,754
19	1,176	0,797	0,569	0,321	0,046	0,045	0,500	2,352
20	0,445	0,198	0,113	0,065	0,046	0,045	0,500	0,890
21	0,348	0,155	0,099	0,061	0,046	0,045	0,500	0,696
22	0,537	0,252	0,151	0,091	0,046	0,045	0,500	1,074
23	1,477	0,662	0,376	0,250	0,080	0,094	0,500	2,954
24	0,823	0,267	0,169	0,163	0,080	0,094	0,500	1,646
25	1,492	0,692	0,436	0,321	0,080	0,094	0,500	2,984
26	0,883	0,333	0,211	0,151	0,080	0,094	0,500	1,766
27	1,085	0,451	0,270	0,192	0,080	0,094	0,500	2,170
28	0,468	0,152	0,107	0,085	0,080	0,094	0,500	0,936
29	0,692	0,221	0,149	0,105	0,080	0,094	0,500	1,384
30	1,000	0,377	0,228	0,148	0,080	0,094	0,500	2,000
31	1,133	0,622	0,403	0,264	0,080	0,094	0,500	2,266
32	1,107	0,576	0,362	0,245	0,080	0,094	0,500	2,214
33	1,151	0,534	0,352	0,226	0,080	0,094	0,500	2,302
34	0,722	0,339	0,261	0,192	0,080	0,094	0,500	1,444
35	1,736	1,050	0,746	0,482	0,080	0,094	0,500	3,472
36	0,921	0,579	0,384	0,266	0,080	0,094	0,500	1,842
37	1,039	0,527	0,323	0,232	0,080	0,094	0,500	2,078

38	0,892	0,531	0,324	0,219	0,080	0,094	0,500	1,784
39	0,496	0,218	0,147	0,126	0,080	0,094	0,500	0,992
40	1,239	0,788	0,467	0,318	0,080	0,094	0,500	2,478
41	1,450	1,067	0,708	0,439	0,080	0,094	0,500	2,900
42	0,689	0,314	0,189	0,139	0,080	0,094	0,500	1,378
43	0,821	0,678	0,418	0,274	0,080	0,094	0,500	1,642
44	0,585	0,264	0,156	0,119	0,080	0,094	0,500	1,170
45	1,375	0,536	0,366	0,292	0,081	0,080	0,500	2,750
46	0,696	0,214	0,126	0,126	0,081	0,080	0,500	1,392
47	1,293	0,541	0,320	0,187	0,081	0,080	0,500	2,586
48	1,280	0,489	0,269	0,168	0,081	0,080	0,500	2,560
49	1,113	0,299	0,171	0,114	0,081	0,080	0,500	2,226
50	1,807	0,689	0,384	0,228	0,081	0,080	0,500	3,614
51	1,780	0,724	0,462	0,302	0,081	0,080	0,500	3,560
52	0,624	0,201	0,140	0,111	0,081	0,080	0,500	1,248
53	2,042	0,963	0,658	0,406	0,081	0,080	0,500	4,084
54	1,302	0,449	0,264	0,160	0,081	0,080	0,500	2,604
55	1,318	0,385	0,234	0,133	0,081	0,080	0,500	2,636
56	1,327	0,627	0,432	0,329	0,081	0,080	0,500	2,654
57	0,943	0,454	0,301	0,224	0,081	0,080	0,500	1,886
58	1,399	0,495	0,320	0,233	0,081	0,080	0,500	2,798
59	1,463	0,887	0,615	0,425	0,081	0,080	0,500	2,926
60	1,567	0,485	0,425	0,226	0,081	0,080	0,500	3,134
61	0,948	0,257	0,171	0,120	0,081	0,080	0,500	1,896
62	0,921	0,387	0,221	0,150	0,081	0,080	0,500	1,842
63	0,904	0,364	0,235	0,149	0,081	0,080	0,500	1,808
64	1,658	0,936	0,576	0,362	0,081	0,080	0,500	3,316
65	0,679	0,284	0,155	0,144	0,081	0,080	0,500	1,358
66	0,934	0,415	0,273	0,181	0,081	0,080	0,500	1,868
67	2,808	1,873	1,124	0,694	0,046	0,044	0,500	5,616
68	2,919	2,724	2,286	1,707	0,046	0,044	0,500	5,838
69	0,634	0,208	0,111	0,101	0,052	0,047	0,500	1,268
70	1,530	0,484	0,198	0,122	0,046	0,044	0,500	3,060
71	0,823	0,291	0,124	0,102	0,046	0,044	0,500	1,646
72	1,902	0,82	0,441	0,293	0,046	0,044	0,500	3,804
73	0,470	0,165	0,117	0,080	0,052	0,047	0,500	0,940
74	1,342	0,403	0,238	0,161	0,046	0,044	0,500	2,684
75	1,581	0,508	0,245	0,178	0,046	0,044	0,500	3,162
76	0,981	0,464	0,283	0,165	0,052	0,047	0,500	1,962
77	1,617	0,936	0,767	0,337	0,052	0,047	0,500	3,234
78	0,939	0,345	0,198	0,129	0,052	0,047	0,500	1,878
79	1,646	0,789	0,415	0,223	0,046	0,044	0,500	3,292
80	1,694	0,754	0,414	0,244	0,046	0,044	0,500	3,388

81	1,314	0,656	0,346	0,189	0,046	0,044	0,500	2,628
82	1,886	1,081	0,631	0,389	0,052	0,047	0,500	3,772
83	1,611	0,856	0,525	0,327	0,052	0,047	0,500	3,222
84	0,717	0,202	0,126	0,088	0,046	0,044	0,500	1,434
85	1,523	0,99	0,617	0,396	0,046	0,044	0,500	3,046
86	1,744	0,99	0,617	0,396	0,046	0,044	0,500	3,488
87	2,505	1,568	1,043	0,542	0,046	0,044	0,500	5,010
88	1,733	0,835	0,520	0,265	0,046	0,044	0,500	3,466
89	1,571	0,758	0,457	0,279	0,044	0,044	0,500	3,142
90	1,755	0,771	0,479	0,250	0,044	0,044	0,500	3,510
91	1,205	0,408	0,251	0,145	0,044	0,044	0,500	2,410
92	0,538	0,171	0,118	0,079	0,044	0,044	0,500	1,076
93	1,007	0,474	0,327	0,177	0,044	0,044	0,500	2,014
94	1,453	0,617	0,368	0,205	0,044	0,044	0,500	2,906
95	0,916	0,377	0,206	0,130	0,044	0,044	0,500	1,832
96	1,361	0,563	0,322	0,185	0,044	0,044	0,500	2,722
97	1,587	0,958	0,707	0,462	0,044	0,044	0,500	3,174
98	2,574	1,779	1,452	1,019	0,044	0,044	0,500	5,148
99	1,551	0,848	0,629	0,426	0,044	0,044	0,500	3,102
100	0,793	0,366	0,209	0,142	0,044	0,044	0,500	1,586
101	0,719	0,218	0,124	0,078	0,044	0,044	0,500	1,438
102	0,950	0,361	0,198	0,135	0,044	0,044	0,500	1,900
103	1,569	1,170	0,756	0,503	0,044	0,044	0,500	3,138
104	1,815	0,591	0,304	0,171	0,044	0,044	0,500	3,630
105	1,830	1,076	0,618	0,341	0,044	0,044	0,500	3,660
106	2,108	1,479	1,073	0,671	0,044	0,044	0,500	4,216
107	1,206	0,401	0,215	0,127	0,044	0,044	0,500	2,412
108	2,255	1,495	0,979	0,565	0,044	0,044	0,500	4,510
109	1,339	0,700	0,422	0,240	0,044	0,044	0,500	2,678
110	0,572	0,211	0,140	0,083	0,044	0,044	0,500	1,144
111	2,110	1,828	1,168	0,813	0,047	0,050	0,500	4,220
112	1,857	0,642	0,424	0,203	0,047	0,050	0,500	3,714
113	1,027	0,653	0,623	0,462	0,047	0,050	0,500	2,054
114	1,533	0,972	0,620	0,503	0,047	0,050	0,500	3,066
115	1,985	1,126	0,731	0,573	0,047	0,050	0,500	3,970
116	1,347	0,392	0,219	0,135	0,047	0,050	0,500	2,694
117	1,793	0,847	0,464	0,280	0,047	0,050	0,500	3,586
118	2,204	0,993	0,567	0,343	0,047	0,050	0,500	4,408
119	2,596	1,505	1,027	0,745	0,047	0,050	0,500	5,192
120	1,867	0,776	0,409	0,245	0,047	0,050	0,500	3,734
121	1,235	0,553	0,310	0,183	0,047	0,050	0,500	2,470
122	1,168	0,723	0,640	0,563	0,047	0,050	0,500	2,336
123	1,383	0,645	0,608	0,516	0,047	0,050	0,500	2,766

124	1,306	0,666	0,401	0,248	0,052	0,047	0,500	2,612
125	1,376	0,617	0,392	0,222	0,052	0,047	0,500	2,752
126	1,212	0,692	0,425	0,268	0,052	0,047	0,500	2,424
127	0,823	0,333	0,215	0,126	0,052	0,047	0,500	1,646
128	1,142	0,415	0,241	0,149	0,052	0,047	0,500	2,284
129	1,931	0,987	0,604	0,340	0,047	0,050	0,500	3,862
130	1,853	0,886	0,499	0,271	0,047	0,050	0,500	3,706
131	2,634	1,948	1,470	1,011	0,047	0,050	0,500	5,268
132	1,773	1,099	0,589	0,337	0,047	0,050	0,500	3,546
133	2,248	1,534	1,341	1,041	0,086	0,080	0,500	4,496
134	1,634	0,527	0,363	0,235	0,086	0,080	0,500	3,268
135	3,805	1,449	0,839	0,456	0,086	0,080	0,500	7,610
136	1,771	0,838	0,512	0,337	0,086	0,080	0,500	3,542
137	1,746	0,783	0,491	0,287	0,086	0,080	0,500	3,492
138	2,791	1,909	1,332	0,737	0,086	0,080	0,500	5,582
139	1,799	0,674	0,417	0,227	0,086	0,080	0,500	3,598
140	1,256	0,509	0,356	0,235	0,086	0,080	0,500	2,512
141	1,657	0,786	0,504	0,289	0,086	0,080	0,500	3,314
142	1,668	0,524	0,307	0,175	0,086	0,080	0,500	3,336
143	1,996	0,806	0,488	0,286	0,086	0,080	0,500	3,992
144	2,193	1,060	0,725	0,408	0,086	0,080	0,500	4,386
145	1,568	0,723	0,486	0,277	0,086	0,080	0,500	3,136
146	1,876	0,906	0,569	0,314	0,086	0,080	0,500	3,752
147	1,670	0,661	0,371	0,242	0,086	0,080	0,500	3,340
148	1,006	0,467	0,272	0,198	0,086	0,080	0,500	2,012
149	1,736	0,781	0,449	0,280	0,086	0,080	0,500	3,472
150	1,629	0,662	0,408	0,239	0,086	0,080	0,500	3,258
151	1,726	0,728	0,424	0,237	0,086	0,080	0,500	3,452
152	1,448	0,732	0,485	0,485	0,086	0,080	0,500	2,896
153	1,732	1,158	0,704	0,452	0,086	0,080	0,500	3,464
154	1,726	0,921	0,558	0,365	0,086	0,080	0,500	3,452
155	1,377	0,509	0,307	0,215	0,058	0,047	0,500	2,754
156	1,628	0,924	0,523	0,301	0,058	0,047	0,500	3,256
157	0,693	0,214	0,140	0,104	0,058	0,047	0,500	1,386
158	1,334	0,563	0,350	0,251	0,058	0,047	0,500	2,668
159	1,799	0,977	0,710	0,305	0,058	0,047	0,500	3,598
160	0,963	0,319	0,188	0,114	0,058	0,047	0,500	1,926
161	2,205	1,371	0,859	0,666	0,058	0,047	0,500	4,410
162	1,294	0,787	0,506	0,303	0,058	0,047	0,500	2,588
163	1,040	0,515	0,302	0,173	0,058	0,047	0,500	2,080
164	2,132	1,205	0,661	0,403	0,058	0,047	0,500	4,264
165	2,453	2,030	1,535	1,099	0,058	0,047	0,500	4,906
166	2,102	1,022	0,711	0,464	0,058	0,047	0,500	4,204

167	2,425	1,404	0,914	0,552	0,058	0,047	0,500	4,850
168	1,739	0,783	0,467	0,244	0,058	0,047	0,500	3,478
169	0,836	0,301	0,199	0,121	0,058	0,047	0,500	1,672
170	1,632	1,267	0,883	0,747	0,058	0,047	0,500	3,264
171	1,158	0,382	0,193	0,111	0,058	0,047	0,500	2,316
172	1,853	0,933	0,664	0,369	0,058	0,047	0,500	3,706
173	0,938	0,447	0,204	0,131	0,058	0,047	0,500	1,876
174	1,645	0,789	0,447	0,236	0,058	0,047	0,500	3,290
175	1,383	0,709	0,427	0,244	0,058	0,047	0,500	2,766
176	0,836	0,431	0,274	0,162	0,058	0,047	0,500	1,672
177	2,305	1,463	0,897	0,457	0,079	0,061	0,500	4,610
178	0,417	0,150	0,087	0,067	0,052	0,047	0,500	0,834
179	1,341	0,507	0,223	0,083	0,079	0,061	0,500	2,682
180	1,349	0,512	0,319	0,151	0,079	0,061	0,500	2,698
181	1,254	0,541	0,294	0,184	0,052	0,047	0,500	2,508
182	1,355	0,625	0,318	0,129	0,079	0,061	0,500	2,710
183	1,071	0,456	0,148	0,040	0,079	0,061	0,500	2,142
184	1,451	0,661	0,394	0,177	0,079	0,061	0,500	2,902
185	1,983	0,847	0,387	0,155	0,079	0,061	0,500	3,966
186	2,493	1,352	0,786	0,421	0,079	0,061	0,500	4,986
187	1,684	0,608	0,328	0,19	0,079	0,061	0,500	3,368
188	1,441	1,190	0,712	0,439	0,079	0,061	0,500	2,882
189	0,935	0,404	0,213	0,091	0,079	0,061	0,500	1,870
190	0,700	0,520	0,357	0,151	0,079	0,061	0,500	1,400
191	1,147	0,491	0,294	0,153	0,079	0,061	0,500	2,294
192	2,301	1,071	0,611	0,369	0,079	0,061	0,500	4,602
193	1,336	0,540	0,619	0,159	0,079	0,061	0,500	2,672
194	1,213	1,071	0,575	0,394	0,079	0,061	0,500	2,426
195	1,473	0,626	0,319	0,158	0,079	0,061	0,500	2,946
196	0,367	0,324	0,125	0,048	0,079	0,061	0,500	0,734
197	1,037	0,388	0,151	0,066	0,079	0,061	0,500	2,074
198	0,802	0,285	0,082	0,014	0,079	0,061	0,500	1,604
199	1,825	0,980	0,651	0,371	0,055	0,050	0,500	3,650
200	1,049	0,621	0,428	0,218	0,055	0,050	0,500	2,098
201	0,666	0,247	0,159	0,102	0,055	0,050	0,500	1,332
202	1,237	0,577	0,368	0,253	0,055	0,050	0,500	2,474
203	1,196	0,596	0,392	0,235	0,055	0,050	0,500	2,392
204	1,147	0,509	0,317	0,195	0,055	0,050	0,500	2,294
205	0,947	0,327	0,204	0,132	0,055	0,050	0,500	1,894
206	1,041	0,454	0,264	0,161	0,055	0,050	0,500	2,082
207	0,537	0,211	0,140	0,105	0,055	0,050	0,500	1,074
208	0,714	0,269	0,176	0,122	0,055	0,050	0,500	1,428
209	1,122	0,437	0,273	0,175	0,055	0,050	0,500	2,244

210	0,711	0,272	0,175	0,134	0,055	0,050	0,500	1,422
211	1,391	0,644	0,413	0,268	0,055	0,050	0,500	2,782
212	1,412	0,510	0,400	0,230	0,055	0,050	0,500	2,824
213	2,340	1,820	1,624	1,222	0,055	0,050	0,500	4,680
214	2,320	1,658	1,321	0,853	0,055	0,050	0,500	4,640
215	1,298	0,613	0,443	0,291	0,055	0,050	0,500	2,596
216	1,337	0,727	0,496	0,275	0,055	0,050	0,500	2,674
217	0,856	0,434	0,279	0,188	0,055	0,050	0,500	1,712
218	1,278	0,529	0,346	0,214	0,055	0,050	0,500	2,556
219	1,420	0,686	0,449	0,389	0,055	0,050	0,500	2,840
220	1,051	0,509	0,315	0,195	0,055	0,050	0,500	2,102
221	2,162	1,696	1,414	1,099	0,050	0,048	0,500	4,324
222	1,448	0,950	0,550	0,275	0,050	0,048	0,500	2,896
223	0,968	0,332	0,187	0,105	0,050	0,048	0,500	1,936
224	1,350	0,470	0,224	0,137	0,050	0,048	0,500	2,700
225	0,851	0,355	0,192	0,114	0,050	0,048	0,500	1,702
226	0,969	0,394	0,229	0,120	0,050	0,048	0,500	1,938
227	1,150	0,656	0,426	0,276	0,050	0,048	0,500	2,300
228	1,543	0,980	0,535	0,458	0,050	0,048	0,500	3,086
229	1,205	0,593	0,291	0,282	0,050	0,048	0,500	2,410
230	0,578	0,307	0,193	0,118	0,050	0,048	0,500	1,156
231	0,521	0,287	0,257	0,144	0,050	0,048	0,500	1,042
232	1,004	0,584	0,458	0,217	0,050	0,048	0,500	2,008
233	1,005	0,440	0,314	0,197	0,050	0,048	0,500	2,010
234	0,757	0,291	0,183	0,082	0,050	0,048	0,500	1,514
235	0,684	0,364	0,096	0,065	0,050	0,048	0,500	1,368
236	1,210	0,633	0,431	0,267	0,050	0,048	0,500	2,420
237	0,933	0,401	0,229	0,107	0,050	0,048	0,500	1,866
238	1,493	0,650	0,359	0,157	0,050	0,048	0,500	2,986
239	0,952	0,288	0,193	0,073	0,050	0,048	0,500	1,904
240	0,405	0,231	0,146	0,089	0,050	0,048	0,500	0,810

**Tabela 3. Anticorpos IgG totais anti-*Leishmania infantum* em indivíduos com doença de Chagas (n=240), diluição 1:200.**

Amostra	Diluição				Média	Média	Cut off	1:200 / Cut off
	1:100	1:200	1:400	1:800	HRP	Branco		
1	0,986	0,380	0,277	0,201	0,048	0,052	0,500	1,972
2	1,809	0,956	0,559	0,328	0,048	0,052	0,500	3,618
3	2,157	1,000	0,552	0,372	0,048	0,052	0,500	4,314
4	1,371	0,527	0,308	0,196	0,048	0,052	0,500	2,742
5	1,880	0,821	0,438	0,330	0,048	0,052	0,500	3,760
6	2,207	1,508	0,871	0,492	0,048	0,052	0,500	4,414
7	2,684	1,724	0,921	0,500	0,048	0,052	0,500	5,368
8	2,629	0,887	0,491	0,286	0,048	0,052	0,500	5,258
9	1,888	0,930	0,553	0,355	0,048	0,052	0,500	3,776
10	1,845	0,789	0,447	0,231	0,048	0,052	0,500	3,690
11	1,436	0,631	0,423	0,251	0,048	0,052	0,500	2,872
12	2,233	1,163	0,745	0,439	0,048	0,052	0,500	4,466
13	2,743	1,109	0,725	0,368	0,048	0,052	0,500	5,486
14	1,453	0,618	0,427	0,226	0,048	0,052	0,500	2,906
15	1,623	0,993	0,622	0,373	0,048	0,052	0,500	3,246
16	1,277	0,615	0,337	0,260	0,048	0,052	0,500	2,554
17	2,061	1,255	0,805	0,481	0,048	0,052	0,500	4,122
18	2,483	1,400	0,831	0,474	0,048	0,052	0,500	4,966
19	1,144	0,458	0,266	0,175	0,048	0,052	0,500	2,288
20	1,327	1,135	0,376	0,235	0,048	0,052	0,500	2,654
21	1,074	0,405	0,196	0,129	0,048	0,052	0,500	2,148
22	1,208	0,526	0,312	0,231	0,048	0,052	0,500	2,416
23	1,418	0,548	0,353	0,227	0,082	0,058	0,500	2,836
24	1,656	0,725	0,446	0,285	0,082	0,058	0,500	3,312
25	1,574	0,437	0,296	0,196	0,082	0,058	0,500	3,148
26	2,333	1,146	0,822	0,869	0,082	0,058	0,500	4,666
27	1,169	0,510	0,263	0,174	0,082	0,058	0,500	2,338
28	1,014	0,489	0,350	0,252	0,082	0,058	0,500	2,028
29	1,073	0,450	0,329	0,212	0,082	0,058	0,500	2,146
30	1,837	0,791	0,473	0,328	0,082	0,058	0,500	3,674
31	1,567	0,554	0,359	0,245	0,082	0,058	0,500	3,134
32	1,003	0,396	0,248	0,183	0,082	0,058	0,500	2,006
33	1,113	0,470	0,307	0,214	0,082	0,058	0,500	2,226
34	1,286	0,926	0,584	0,268	0,082	0,058	0,500	2,572
35	2,019	1,054	0,597	0,366	0,082	0,058	0,500	4,038
36	2,295	1,133	0,757	0,447	0,082	0,058	0,500	4,590
37	0,753	0,282	0,182	0,123	0,082	0,058	0,500	1,506
38	2,015	1,080	0,731	0,402	0,082	0,058	0,500	4,030
39	1,095	0,437	0,270	0,170	0,082	0,058	0,500	2,190

40	1,622	0,688	0,520	0,313	0,082	0,058	0,500	3,244
41	2,432	1,416	0,985	0,715	0,082	0,058	0,500	4,864
42	1,157	0,414	0,426	0,290	0,082	0,058	0,500	2,314
43	1,917	0,834	0,656	0,438	0,082	0,058	0,500	3,834
44	1,128	0,517	0,388	0,251	0,082	0,058	0,500	2,256
45	2,077	0,893	0,487	0,332	0,058	0,048	0,500	4,154
46	1,143	0,373	0,213	0,138	0,058	0,048	0,500	2,286
47	1,018	0,279	0,159	0,131	0,058	0,048	0,500	2,036
48	2,662	1,307	0,829	0,559	0,058	0,048	0,500	5,324
49	1,135	0,329	0,225	0,216	0,058	0,048	0,500	2,270
50	1,673	0,590	0,311	0,170	0,058	0,048	0,500	3,346
51	2,554	1,535	1,114	0,686	0,058	0,048	0,500	5,108
52	1,343	0,469	0,283	0,166	0,058	0,048	0,500	2,686
53	0,987	0,429	0,240	0,161	0,058	0,048	0,500	1,974
54	0,609	0,261	0,179	0,118	0,058	0,048	0,500	1,218
55	1,528	0,929	0,546	0,320	0,058	0,048	0,500	3,056
56	1,748	0,936	0,801	0,284	0,058	0,048	0,500	3,496
57	1,042	0,325	0,188	0,126	0,058	0,048	0,500	2,084
58	1,545	0,681	0,401	0,224	0,058	0,048	0,500	3,090
59	0,609	0,242	0,162	0,098	0,058	0,048	0,500	1,218
60	1,419	0,593	0,321	0,179	0,058	0,048	0,500	2,838
61	2,692	2,389	1,987	1,168	0,058	0,048	0,500	5,384
62	1,592	0,791	0,431	0,290	0,058	0,048	0,500	3,184
63	1,260	0,474	0,26	0,144	0,058	0,048	0,500	2,520
64	2,667	2,583	2,295	1,818	0,058	0,048	0,500	5,334
65	2,046	1,088	0,674	0,391	0,058	0,048	0,500	4,092
66	1,808	1,056	0,624	0,335	0,058	0,048	0,500	3,616
67	2,269	0,772	0,606	0,452	0,051	0,047	0,500	4,538
68	1,720	1,005	0,595	0,319	0,051	0,047	0,500	3,440
69	2,672	1,507	0,963	0,540	0,051	0,047	0,500	5,344
70	1,770	0,849	0,500	0,310	0,051	0,047	0,500	3,540
71	2,244	1,108	0,752	0,427	0,051	0,047	0,500	4,488
72	1,742	0,836	0,422	0,231	0,051	0,047	0,500	3,484
73	2,296	1,001	0,585	0,378	0,051	0,047	0,500	4,592
74	1,721	0,709	0,420	0,236	0,051	0,047	0,500	3,442
75	1,809	0,637	0,433	0,380	0,051	0,047	0,500	3,618
76	2,900	2,101	1,472	1,000	0,051	0,047	0,500	5,800
77	1,289	0,602	0,255	0,169	0,051	0,047	0,500	2,578
78	1,798	0,804	0,380	0,249	0,051	0,047	0,500	3,596
79	2,342	1,335	0,860	0,528	0,051	0,047	0,500	4,684
80	0,708	0,308	0,269	0,156	0,051	0,047	0,500	1,416
81	1,082	0,294	0,186	0,141	0,051	0,047	0,500	2,164
82	2,263	0,991	0,656	0,394	0,051	0,047	0,500	4,526

83	1,152	0,397	0,232	0,130	0,051	0,047	0,500	2,304
84	2,033	0,631	0,327	0,212	0,051	0,047	0,500	4,066
85	1,664	0,697	0,458	0,376	0,051	0,047	0,500	3,328
86	1,095	0,354	0,204	0,147	0,051	0,047	0,500	2,190
87	3,377	2,226	1,544	0,996	0,051	0,047	0,500	6,754
88	1,127	0,369	0,222	0,148	0,051	0,047	0,500	2,254
89	1,384	0,444	0,394	0,294	0,093	0,052	0,500	2,768
90	2,950	1,104	0,894	0,626	0,093	0,052	0,500	5,900
91	1,610	1,261	0,952	0,632	0,093	0,052	0,500	3,220
92	0,869	0,390	0,282	0,226	0,093	0,052	0,500	1,738
93	1,367	0,660	0,479	0,352	0,093	0,052	0,500	2,734
94	1,250	0,740	0,611	0,291	0,093	0,052	0,500	2,500
95	0,689	0,250	0,221	0,205	0,093	0,052	0,500	1,378
96	1,178	0,941	0,535	0,303	0,093	0,052	0,500	2,356
97	1,538	0,807	0,511	0,372	0,093	0,052	0,500	3,076
98	0,938	0,364	0,281	0,220	0,093	0,052	0,500	1,876
99	0,545	0,275	0,245	0,174	0,093	0,052	0,500	1,090
100	1,384	0,631	0,521	0,347	0,093	0,052	0,500	2,768
101	1,514	0,852	0,669	0,425	0,093	0,052	0,500	3,028
102	1,227	0,505	0,395	0,269	0,093	0,052	0,500	2,454
103	2,328	1,822	1,462	1,022	0,093	0,052	0,500	4,656
104	1,195	0,427	0,283	0,133	0,093	0,052	0,500	2,390
105	1,982	1,072	0,655	0,298	0,093	0,052	0,500	3,964
106	1,836	1,055	0,763	0,490	0,093	0,052	0,500	3,672
107	1,678	0,970	0,691	0,506	0,093	0,052	0,500	3,356
108	2,755	2,312	1,974	1,516	0,093	0,052	0,500	5,510
109	1,405	0,807	0,586	0,400	0,093	0,052	0,500	2,810
110	0,924	0,416	0,320	0,268	0,093	0,052	0,500	1,848
111	1,047	0,485	0,356	0,195	0,079	0,059	0,500	2,094
112	1,097	0,541	0,267	0,181	0,079	0,059	0,500	2,194
113	2,212	1,811	1,534	1,104	0,079	0,059	0,500	4,424
114	0,853	0,417	0,357	0,197	0,079	0,059	0,500	1,706
115	2,408	1,853	1,664	1,089	0,079	0,059	0,500	4,816
116	0,973	0,410	0,326	0,217	0,079	0,059	0,500	1,946
117	1,593	0,830	0,530	0,368	0,079	0,059	0,500	3,186
118	2,924	0,819	0,541	0,362	0,079	0,059	0,500	5,848
119	1,468	0,665	0,453	0,297	0,079	0,059	0,500	2,936
120	0,861	0,347	0,243	0,195	0,079	0,059	0,500	1,722
121	1,670	0,765	0,513	0,328	0,079	0,059	0,500	3,340
122	1,178	0,635	0,463	0,312	0,079	0,059	0,500	2,356
123	1,454	0,695	0,394	0,280	0,079	0,059	0,500	2,908
124	1,434	0,826	0,495	0,341	0,079	0,059	0,500	2,868
125	1,061	0,477	0,314	0,253	0,079	0,059	0,500	2,122

126	0,802	0,347	0,245	0,167	0,079	0,059	0,500	1,604
127	1,364	0,511	0,305	0,219	0,079	0,059	0,500	2,728
128	1,010	0,496	0,330	0,233	0,079	0,059	0,500	2,020
129	1,737	0,960	0,542	0,380	0,079	0,059	0,500	3,474
130	1,574	0,876	0,516	0,372	0,079	0,059	0,500	3,148
131	1,399	0,689	0,449	0,346	0,079	0,059	0,500	2,798
132	1,361	1,100	0,694	0,464	0,079	0,059	0,500	2,722
133	2,015	0,933	0,504	0,245	0,050	0,049	0,500	4,030
134	1,470	0,672	0,371	0,157	0,050	0,049	0,500	2,940
135	1,104	0,421	0,262	0,080	0,050	0,049	0,500	2,208
136	1,478	0,548	0,245	0,118	0,050	0,049	0,500	2,956
137	1,536	0,859	0,647	0,191	0,050	0,049	0,500	3,072
138	0,621	0,512	0,505	0,475	0,052	0,051	0,500	1,242
139	1,128	0,634	0,445	0,324	0,050	0,049	0,500	2,256
140	1,600	0,726	0,406	0,218	0,050	0,049	0,500	3,200
141	1,895	0,960	0,535	0,302	0,050	0,049	0,500	3,790
142	2,088	1,376	0,974	0,610	0,050	0,049	0,500	4,176
143	1,125	0,678	0,592	0,499	0,052	0,051	0,500	2,250
144	2,275	1,405	1,322	0,579	0,050	0,049	0,500	4,550
145	1,122	0,343	0,311	0,141	0,050	0,049	0,500	2,244
146	1,194	0,398	0,208	0,046	0,050	0,049	0,500	2,388
147	1,171	0,359	0,325	0,216	0,050	0,049	0,500	2,342
148	1,613	0,784	0,380	0,240	0,050	0,049	0,500	3,226
149	1,711	0,977	0,943	0,269	0,050	0,049	0,500	3,422
150	2,138	1,056	0,596	0,308	0,050	0,049	0,500	4,276
151	0,741	0,430	0,320	0,192	0,050	0,049	0,500	1,482
152	1,500	0,607	0,372	0,164	0,050	0,049	0,500	3,000
153	0,838	0,418	0,385	0,366	0,050	0,049	0,500	1,676
154	1,377	0,653	0,511	0,448	0,050	0,049	0,500	2,754
155	1,075	0,545	0,400	0,269	0,088	0,054	0,500	2,150
156	2,041	0,989	0,614	0,371	0,088	0,054	0,500	4,082
157	1,846	0,835	0,504	0,381	0,088	0,054	0,500	3,692
158	1,083	0,432	0,308	0,253	0,088	0,054	0,500	2,166
159	1,613	0,614	0,400	0,323	0,088	0,054	0,500	3,226
160	0,907	0,352	0,254	0,227	0,088	0,054	0,500	1,814
161	1,198	0,484	0,360	0,270	0,088	0,054	0,500	2,396
162	0,932	0,487	0,440	0,223	0,088	0,054	0,500	1,864
163	0,924	0,404	0,229	0,182	0,088	0,054	0,500	1,848
164	0,867	0,660	0,412	0,285	0,088	0,054	0,500	1,734
165	1,356	0,660	0,412	0,285	0,088	0,054	0,500	2,712
166	0,965	0,552	0,267	0,204	0,088	0,054	0,500	1,930
167	1,033	0,395	0,285	0,221	0,088	0,054	0,500	2,066
168	0,806	0,356	0,241	0,201	0,088	0,054	0,500	1,612

169	1,516	0,783	0,525	0,378	0,088	0,054	0,500	3,032
170	1,378	0,501	0,379	0,244	0,088	0,054	0,500	2,756
171	1,161	0,492	0,302	0,211	0,088	0,054	0,500	2,322
172	0,819	0,395	0,280	0,207	0,088	0,054	0,500	1,638
173	0,659	0,271	0,210	0,192	0,088	0,054	0,500	1,318
174	1,543	0,728	0,507	0,335	0,088	0,054	0,500	3,086
175	0,919	0,438	0,246	0,204	0,088	0,054	0,500	1,838
176	0,991	0,496	0,300	0,223	0,088	0,054	0,500	1,982
177	1,555	0,826	0,506	0,449	0,064	0,058	0,500	3,110
178	2,389	1,829	1,844	1,324	0,064	0,058	0,500	4,778
179	1,021	0,431	0,338	0,257	0,064	0,058	0,500	2,042
180	1,580	0,902	0,608	0,454	0,064	0,058	0,500	3,160
181	1,674	0,714	0,489	0,373	0,064	0,058	0,500	3,348
182	2,704	2,336	1,865	1,737	0,064	0,058	0,500	5,408
183	1,699	1,019	0,811	0,344	0,064	0,058	0,500	3,398
184	1,306	0,351	0,249	0,202	0,064	0,058	0,500	2,612
185	0,296	0,165	0,143	0,147	0,064	0,058	0,500	0,592
186	0,910	0,347	0,253	0,219	0,064	0,058	0,500	1,820
187	1,178	0,708	0,399	0,314	0,064	0,058	0,500	2,356
188	2,380	1,033	0,624	0,443	0,064	0,058	0,500	4,760
189	1,836	0,803	0,497	0,303	0,064	0,058	0,500	3,672
190	2,225	1,350	0,887	0,631	0,064	0,058	0,500	4,450
191	1,676	1,241	0,649	0,422	0,064	0,058	0,500	3,352
192	1,586	0,867	0,564	0,380	0,064	0,058	0,500	3,172
193	1,621	0,816	0,576	0,387	0,064	0,058	0,500	3,242
194	1,555	0,827	0,579	0,399	0,064	0,058	0,500	3,110
195	1,760	0,836	0,472	0,288	0,064	0,058	0,500	3,520
196	1,143	0,624	0,436	0,317	0,064	0,058	0,500	2,286
197	0,735	0,358	0,267	0,212	0,064	0,058	0,500	1,470
198	1,282	0,582	0,370	0,294	0,064	0,058	0,500	2,564
199	0,788	0,272	0,171	0,115	0,048	0,048	0,500	1,576
200	0,387	0,142	0,094	0,072	0,048	0,048	0,500	0,774
201	0,997	0,406	0,256	0,166	0,048	0,048	0,500	1,994
202	1,006	0,444	0,289	0,195	0,048	0,048	0,500	2,012
203	0,418	0,111	0,083	0,067	0,048	0,048	0,500	0,836
204	0,621	0,271	0,179	0,123	0,048	0,048	0,500	1,242
205	0,646	0,213	0,135	0,099	0,048	0,048	0,500	1,292
206	0,904	0,375	0,224	0,153	0,048	0,048	0,500	1,808
207	0,669	0,238	0,145	0,109	0,048	0,048	0,500	1,338
208	0,507	0,132	0,091	0,070	0,048	0,048	0,500	1,014
209	1,054	0,277	0,187	0,133	0,048	0,048	0,500	2,108
210	1,490	0,648	0,398	0,234	0,048	0,048	0,500	2,980
211	1,022	0,460	0,286	0,170	0,048	0,048	0,500	2,044

212	0,869	0,355	0,213	0,137	0,048	0,048	0,500	1,738
213	0,649	0,218	0,145	0,099	0,048	0,048	0,500	1,298
214	1,022	0,568	0,373	0,238	0,048	0,048	0,500	2,044
215	1,393	0,890	0,713	0,492	0,048	0,048	0,500	2,786
216	1,037	0,535	0,383	0,243	0,048	0,048	0,500	2,074
217	0,934	0,482	0,316	0,209	0,048	0,048	0,500	1,868
218	0,863	0,404	0,234	0,133	0,048	0,048	0,500	1,726
219	1,154	0,421	0,259	0,153	0,048	0,048	0,500	2,308
220	0,901	0,447	0,269	0,174	0,048	0,048	0,500	1,802
221	1,234	0,505	0,297	0,168	0,051	0,056	0,500	2,468
222	1,247	0,677	0,637	0,343	0,051	0,056	0,500	2,494
223	0,483	0,156	0,122	0,106	0,051	0,056	0,500	0,966
224	0,946	0,489	0,322	0,201	0,051	0,056	0,500	1,892
225	0,541	0,177	0,117	0,095	0,051	0,056	0,500	1,082
226	1,076	0,535	0,374	0,318	0,051	0,056	0,500	2,152
227	0,940	0,259	0,201	0,139	0,051	0,056	0,500	1,880
228	0,555	0,236	0,163	0,138	0,051	0,056	0,500	1,110
229	1,419	0,559	0,395	0,232	0,051	0,056	0,500	2,838
230	0,752	0,282	0,175	0,109	0,051	0,056	0,500	1,504
231	0,684	0,253	0,402	0,254	0,051	0,056	0,500	1,368
232	1,578	0,302	0,182	0,143	0,051	0,056	0,500	3,156
233	1,125	0,634	0,401	0,258	0,051	0,056	0,500	2,250
234	0,988	0,290	0,179	0,153	0,051	0,056	0,500	1,976
235	1,458	0,521	0,319	0,196	0,051	0,056	0,500	2,916
236	1,269	0,714	0,443	0,300	0,051	0,056	0,500	2,538
237	0,856	0,249	0,165	0,120	0,051	0,056	0,500	1,712
238	0,931	0,440	0,478	0,203	0,051	0,056	0,500	1,862
239	1,101	0,478	0,309	0,260	0,051	0,056	0,500	2,202
240	0,651	0,247	0,155	0,117	0,051	0,056	0,500	1,302

---

**Tabela 4. Anticorpos IgG totais anti-*Trypanosoma cruzi* em indivíduos com Leishmaniose Visceral (n=240), diluição 1:200.**

Amostra	Diluição				Média	Média	Cut off	1:200 / Cut off
	1:100	1:200	1:400	1:800	HRP	Branco		
1	1,174	0,620	0,489	0,346	0,071	0,047	0,500	1,240
2	1,023	0,513	0,350	0,226	0,071	0,047	0,500	1,026
3	1,250	0,573	0,415	0,254	0,071	0,047	0,500	1,146
4	0,764	0,325	0,221	0,154	0,071	0,047	0,500	0,650
5	1,182	0,454	0,313	0,192	0,071	0,047	0,500	0,908
6	1,164	0,589	0,397	0,273	0,071	0,047	0,500	1,178
7	1,359	0,828	0,558	0,385	0,071	0,047	0,500	1,656
8	1,304	0,659	0,491	0,328	0,071	0,047	0,500	1,318
9	1,044	0,439	0,256	0,177	0,071	0,047	0,500	0,878
10	1,106	0,367	0,215	0,140	0,071	0,047	0,500	0,734
11	0,749	0,356	0,239	0,156	0,071	0,047	0,500	0,712
12	0,813	0,393	0,292	0,215	0,071	0,047	0,500	0,786
13	1,386	0,703	0,468	0,318	0,071	0,047	0,500	1,406
14	0,898	0,466	0,452	0,267	0,071	0,047	0,500	0,932
15	0,852	0,349	0,244	0,155	0,071	0,047	0,500	0,698
16	0,574	0,257	0,203	0,152	0,071	0,047	0,500	0,514
17	1,418	0,718	0,525	0,321	0,071	0,047	0,500	1,436
18	1,628	0,703	0,459	0,291	0,071	0,047	0,500	1,406
19	0,734	0,337	0,240	0,181	0,071	0,047	0,500	0,674
20	0,733	0,422	0,297	0,192	0,071	0,047	0,500	0,844
21	0,452	0,227	0,176	0,117	0,071	0,047	0,500	0,454
22	1,179	0,722	0,502	0,318	0,071	0,047	0,500	1,444
23	1,137	0,738	0,272	0,191	0,082	0,049	0,500	1,476
24	0,942	0,419	0,379	0,166	0,082	0,049	0,500	0,838
25	0,675	0,436	0,318	0,226	0,082	0,049	0,500	0,872
26	1,517	0,684	0,389	0,261	0,082	0,049	0,500	1,368
27	0,649	0,274	0,180	0,170	0,082	0,049	0,500	0,548
28	0,409	0,207	0,165	0,115	0,082	0,049	0,500	0,414
29	0,590	0,290	0,204	0,147	0,082	0,049	0,500	0,580
30	0,801	0,261	0,187	0,134	0,082	0,049	0,500	0,522
31	0,664	0,418	0,266	0,184	0,082	0,049	0,500	0,836
32	0,523	0,261	0,188	0,153	0,082	0,049	0,500	0,522
33	0,508	0,247	0,192	0,146	0,082	0,049	0,500	0,494
34	0,771	0,321	0,211	0,155	0,082	0,049	0,500	0,642
35	0,571	0,251	0,182	0,125	0,082	0,049	0,500	0,502
36	1,250	0,891	0,669	0,514	0,082	0,049	0,500	1,782
37	0,427	0,295	0,155	0,115	0,082	0,049	0,500	0,590
38	0,856	0,364	0,243	0,167	0,082	0,049	0,500	0,728
39	0,455	0,192	0,144	0,110	0,082	0,049	0,500	0,384

40	0,648	0,406	0,308	0,213	0,082	0,049	0,500	0,812
41	1,071	0,590	0,391	0,259	0,082	0,049	0,500	1,180
42	0,751	0,254	0,162	0,129	0,082	0,049	0,500	0,508
43	1,009	0,527	0,348	0,232	0,082	0,049	0,500	1,054
44	0,711	0,393	0,246	0,171	0,082	0,049	0,500	0,786
45	1,384	0,720	0,424	0,293	0,067	0,048	0,500	1,440
46	1,864	0,518	0,257	0,176	0,067	0,048	0,500	1,036
47	0,889	0,397	0,175	0,123	0,067	0,048	0,500	0,794
48	1,322	0,817	0,477	0,304	0,067	0,048	0,500	1,634
49	0,849	0,440	0,289	0,149	0,067	0,048	0,500	0,880
50	1,043	0,686	0,534	0,156	0,067	0,048	0,500	1,372
51	1,193	0,878	0,439	0,252	0,067	0,048	0,500	1,756
52	1,259	0,852	0,528	0,327	0,067	0,048	0,500	1,704
53	0,988	0,556	0,451	0,344	0,067	0,048	0,500	1,112
54	0,736	0,344	0,293	0,269	0,067	0,048	0,500	0,688
55	1,056	0,722	0,446	0,245	0,067	0,048	0,500	1,444
56	1,237	0,745	0,483	0,291	0,067	0,048	0,500	1,490
57	0,669	0,214	0,137	0,089	0,067	0,048	0,500	0,428
58	0,845	0,495	0,275	0,155	0,067	0,048	0,500	0,990
59	0,781	0,519	0,310	0,188	0,067	0,048	0,500	1,038
60	1,012	0,551	0,358	0,224	0,067	0,048	0,500	1,102
61	1,175	0,774	0,662	0,426	0,067	0,048	0,500	1,548
62	0,699	0,357	0,226	0,153	0,067	0,048	0,500	0,714
63	0,770	0,389	0,254	0,152	0,067	0,048	0,500	0,778
64	1,371	0,929	0,774	0,533	0,067	0,048	0,500	1,858
65	0,793	0,431	0,248	0,146	0,067	0,048	0,500	0,862
66	0,968	0,457	0,308	0,178	0,067	0,048	0,500	0,914
67	0,875	0,493	0,382	0,260	0,078	0,048	0,500	0,986
68	0,338	0,199	0,150	0,124	0,078	0,048	0,500	0,398
69	1,178	0,607	0,395	0,184	0,078	0,048	0,500	1,214
70	0,890	0,427	0,312	0,206	0,078	0,048	0,500	0,854
71	0,826	0,428	0,306	0,293	0,078	0,048	0,500	0,856
72	0,657	0,405	0,311	0,274	0,078	0,048	0,500	0,810
73	0,846	0,306	0,221	0,160	0,078	0,048	0,500	0,612
74	0,908	0,379	0,273	0,188	0,078	0,048	0,500	0,758
75	0,660	0,304	0,210	0,158	0,078	0,048	0,500	0,608
76	0,891	0,554	0,404	0,299	0,078	0,048	0,500	1,108
77	0,430	0,181	0,135	0,112	0,078	0,048	0,500	0,362
78	0,594	0,274	0,181	0,131	0,078	0,048	0,500	0,548
79	1,137	0,669	0,433	0,280	0,078	0,048	0,500	1,338
80	0,525	0,191	0,126	0,104	0,078	0,048	0,500	0,382
81	0,431	0,197	0,141	0,109	0,078	0,048	0,500	0,394
82	0,845	0,514	0,348	0,211	0,078	0,048	0,500	1,028

83	0,927	0,529	0,408	0,285	0,078	0,048	0,500	1,058
84	0,648	0,330	0,219	0,152	0,078	0,048	0,500	0,660
85	0,564	0,335	0,242	0,159	0,078	0,048	0,500	0,670
86	0,584	0,292	0,204	0,132	0,078	0,048	0,500	0,584
87	1,323	0,952	0,609	0,365	0,078	0,048	0,500	1,904
88	0,737	0,358	0,232	0,154	0,078	0,048	0,500	0,716
89	1,134	0,462	0,293	0,205	0,083	0,051	0,500	0,924
90	3,587	2,236	1,613	1,125	0,083	0,051	0,500	4,472
91	1,121	0,584	0,449	0,297	0,083	0,051	0,500	1,168
92	1,169	0,604	0,443	0,295	0,083	0,051	0,500	1,208
93	1,529	0,683	0,443	0,278	0,083	0,051	0,500	1,366
94	1,172	0,439	0,304	0,200	0,083	0,051	0,500	0,878
95	0,597	0,211	0,155	0,126	0,083	0,051	0,500	0,422
96	1,636	0,902	0,667	0,462	0,083	0,051	0,500	1,804
97	1,227	0,518	0,322	0,211	0,083	0,051	0,500	1,036
98	1,487	0,650	0,444	0,279	0,083	0,051	0,500	1,300
99	0,769	0,310	0,238	0,161	0,083	0,051	0,500	0,620
100	1,379	0,702	0,423	0,293	0,083	0,051	0,500	1,404
101	1,208	0,445	0,268	0,190	0,083	0,051	0,500	0,890
102	1,205	0,387	0,253	0,186	0,083	0,051	0,500	0,774
103	1,599	1,033	0,744	0,555	0,083	0,051	0,500	2,066
104	0,822	0,271	0,170	0,143	0,083	0,051	0,500	0,542
105	1,349	0,749	0,417	0,352	0,083	0,051	0,500	1,498
106	1,884	0,998	0,762	0,566	0,083	0,051	0,500	1,996
107	1,321	0,597	0,408	0,257	0,083	0,051	0,500	1,194
108	1,748	1,179	0,975	0,647	0,083	0,051	0,500	2,358
109	1,339	0,767	0,499	0,323	0,083	0,051	0,500	1,534
110	0,747	0,346	0,231	0,178	0,083	0,051	0,500	0,692
111	0,627	0,391	0,334	0,316	0,049	0,047	0,500	0,782
112	1,036	0,514	0,376	0,331	0,049	0,047	0,500	1,028
113	0,902	0,679	0,602	0,497	0,049	0,047	0,500	1,358
114	0,675	0,382	0,298	0,274	0,049	0,047	0,500	0,764
115	1,218	0,776	0,656	0,553	0,049	0,047	0,500	1,552
116	0,963	0,489	0,384	0,342	0,049	0,047	0,500	0,978
117	0,967	0,544	0,448	0,348	0,049	0,047	0,500	1,088
118	0,941	0,545	0,432	0,385	0,049	0,047	0,500	1,090
119	0,727	0,438	0,340	0,303	0,049	0,047	0,500	0,876
120	0,563	0,320	0,278	0,270	0,049	0,047	0,500	0,640
121	2,063	0,970	0,627	0,435	0,049	0,047	0,500	1,940
122	0,586	0,440	0,368	0,347	0,049	0,047	0,500	0,880
123	0,750	0,486	0,376	0,359	0,049	0,047	0,500	0,972
124	0,924	0,562	0,394	0,351	0,049	0,047	0,500	1,124
125	0,988	0,498	0,363	0,355	0,049	0,047	0,500	0,996

126	0,575	0,432	0,424	0,334	0,049	0,047	0,500	0,864
127	0,899	0,737	0,584	0,540	0,049	0,047	0,500	1,474
128	0,683	0,402	0,303	0,299	0,049	0,047	0,500	0,804
129	0,734	0,440	0,335	0,327	0,049	0,047	0,500	0,880
130	1,023	0,440	0,335	0,327	0,049	0,047	0,500	0,880
131	1,023	0,659	0,476	0,458	0,049	0,047	0,500	1,318
132	1,012	0,514	0,375	0,341	0,049	0,047	0,500	1,028
133	1,325	0,603	0,568	0,330	0,056	0,052	0,500	1,206
134	1,237	0,586	0,268	0,210	0,056	0,052	0,500	1,172
135	0,755	0,440	0,234	0,172	0,056	0,052	0,500	0,880
136	0,851	0,403	0,160	0,133	0,056	0,052	0,500	0,806
137	1,252	0,536	0,230	0,187	0,056	0,052	0,500	1,072
138	0,969	0,354	0,172	0,127	0,056	0,052	0,500	0,708
139	1,349	0,511	0,338	0,289	0,056	0,052	0,500	1,022
140	1,429	0,613	0,369	0,250	0,056	0,052	0,500	1,226
141	1,081	0,631	0,305	0,253	0,056	0,052	0,500	1,262
142	1,971	1,326	0,801	0,579	0,056	0,052	0,500	2,652
143	0,986	0,750	0,389	0,204	0,056	0,052	0,500	1,500
144	1,267	0,487	0,282	0,231	0,056	0,052	0,500	0,974
145	0,944	0,411	0,229	0,229	0,056	0,052	0,500	0,822
146	0,686	0,267	0,208	0,143	0,056	0,052	0,500	0,534
147	1,298	0,970	0,773	0,700	0,056	0,052	0,500	1,940
148	1,879	0,643	0,444	0,290	0,056	0,052	0,500	1,286
149	1,128	0,663	0,452	0,319	0,056	0,052	0,500	1,326
150	1,304	0,481	0,333	0,199	0,056	0,052	0,500	0,962
151	0,464	0,214	0,184	0,166	0,056	0,052	0,500	0,428
152	0,954	0,530	0,401	0,337	0,056	0,052	0,500	1,060
153	0,301	0,166	0,154	0,147	0,056	0,052	0,500	0,332
154	0,946	0,462	0,333	0,241	0,056	0,052	0,500	0,924
155	0,638	0,535	0,443	0,440	0,058	0,067	0,500	1,070
156	0,914	0,683	0,530	0,498	0,058	0,067	0,500	1,366
157	0,788	0,613	0,481	0,475	0,058	0,067	0,500	1,226
158	0,718	0,524	0,432	0,426	0,058	0,067	0,500	1,048
159	1,129	0,676	0,596	0,542	0,058	0,067	0,500	1,352
160	0,822	0,636	0,532	0,462	0,058	0,067	0,500	1,272
161	0,822	0,623	0,524	0,470	0,058	0,067	0,500	1,246
162	0,849	0,594	0,506	0,506	0,058	0,067	0,500	1,188
163	0,616	0,536	0,434	0,428	0,058	0,067	0,500	1,072
164	0,678	0,632	0,471	0,447	0,058	0,067	0,500	1,264
165	0,843	0,643	0,619	0,558	0,058	0,067	0,500	1,286
166	0,628	0,604	0,602	0,528	0,058	0,067	0,500	1,208
167	1,044	0,922	0,769	0,674	0,058	0,067	0,500	1,844
168	0,774	0,637	0,578	0,511	0,058	0,067	0,500	1,274

169	0,957	0,763	0,671	0,665	0,058	0,067	0,500	1,526
170	0,761	0,647	0,609	0,560	0,058	0,067	0,500	1,294
171	0,770	0,626	0,590	0,562	0,058	0,067	0,500	1,252
172	0,871	0,751	0,648	0,606	0,058	0,067	0,500	1,502
173	0,609	0,551	0,539	0,525	0,058	0,067	0,500	1,102
174	0,771	0,681	0,606	0,598	0,058	0,067	0,500	1,362
175	0,673	0,583	0,557	0,544	0,058	0,067	0,500	1,166
176	0,750	0,646	0,592	0,534	0,058	0,067	0,500	1,292
177	0,951	0,440	0,210	0,116	0,059	0,054	0,500	0,880
178	1,159	0,897	0,345	0,216	0,059	0,054	0,500	1,794
179	0,714	0,294	0,154	0,064	0,059	0,054	0,500	0,588
180	1,256	0,697	0,403	0,197	0,059	0,054	0,500	1,394
181	1,311	0,768	0,463	0,313	0,059	0,054	0,500	1,536
182	1,409	1,022	0,668	0,448	0,059	0,054	0,500	2,044
183	0,851	0,809	0,188	0,107	0,059	0,054	0,500	1,618
184	0,995	0,341	0,156	0,084	0,059	0,054	0,500	0,682
185	0,844	0,461	0,292	0,097	0,059	0,054	0,500	0,922
186	0,645	0,311	0,153	0,114	0,059	0,054	0,500	0,622
187	0,315	0,207	0,102	0,052	0,059	0,054	0,500	0,414
188	1,150	0,464	0,288	0,144	0,059	0,054	0,500	0,928
189	0,933	0,358	0,222	0,137	0,059	0,054	0,500	0,716
190	1,276	0,679	0,453	0,308	0,059	0,054	0,500	1,358
191	0,968	0,747	0,194	0,132	0,059	0,054	0,500	1,494
192	0,984	0,335	0,209	0,121	0,059	0,054	0,500	0,670
193	1,065	0,493	0,451	0,338	0,059	0,054	0,500	0,986
194	1,137	0,517	0,337	0,196	0,059	0,054	0,500	1,034
195	1,421	0,474	0,297	0,119	0,059	0,054	0,500	0,948
196	0,655	0,269	0,175	0,132	0,059	0,054	0,500	0,538
197	0,512	0,190	0,127	0,094	0,059	0,054	0,500	0,380
198	1,046	0,440	0,251	0,155	0,059	0,054	0,500	0,880
199	0,673	0,388	0,320	0,228	0,080	0,065	0,500	0,776
200	0,765	0,326	0,179	0,139	0,080	0,065	0,500	0,652
201	1,206	0,488	0,372	0,241	0,080	0,065	0,500	0,976
202	0,891	0,587	0,495	0,357	0,080	0,065	0,500	1,174
203	0,494	0,153	0,133	0,127	0,080	0,065	0,500	0,306
204	0,624	0,267	0,197	0,175	0,080	0,065	0,500	0,534
205	0,754	0,204	0,172	0,150	0,080	0,065	0,500	0,408
206	2,374	0,527	0,484	0,345	0,080	0,065	0,500	1,054
207	1,959	0,124	0,099	0,078	0,080	0,065	0,500	0,248
208	0,574	0,115	0,031	0,002	0,080	0,065	0,500	0,230
209	3,114	0,215	0,210	0,115	0,080	0,065	0,500	0,430
210	1,573	0,514	0,384	0,276	0,080	0,065	0,500	1,028
211	0,960	0,488	0,349	0,240	0,080	0,065	0,500	0,976

212	0,963	0,283	0,229	0,117	0,080	0,065	0,500	0,566
213	0,709	0,273	0,201	0,165	0,080	0,065	0,500	0,546
214	1,053	0,554	0,420	0,349	0,080	0,065	0,500	1,108
215	1,082	0,570	0,419	0,316	0,080	0,065	0,500	1,140
216	1,034	0,534	0,407	0,298	0,080	0,065	0,500	1,068
217	1,246	0,570	0,366	0,270	0,080	0,065	0,500	1,140
218	0,815	0,451	0,307	0,233	0,080	0,065	0,500	0,902
219	1,282	0,609	0,416	0,283	0,080	0,065	0,500	1,218
220	0,959	0,397	0,312	0,260	0,080	0,065	0,500	0,794
221	1,121	0,306	0,271	0,074	0,058	0,066	0,500	0,612
222	1,302	0,688	0,539	0,367	0,058	0,066	0,500	1,376
223	0,835	0,308	0,255	0,154	0,058	0,066	0,500	0,616
224	1,146	0,775	0,444	0,380	0,058	0,066	0,500	1,550
225	0,518	0,184	0,171	0,063	0,058	0,066	0,500	0,368
226	1,271	0,761	0,309	0,259	0,058	0,066	0,500	1,522
227	0,677	0,295	0,246	0,075	0,058	0,066	0,500	0,590
228	0,923	0,255	0,243	0,177	0,058	0,066	0,500	0,510
229	1,843	0,739	0,668	0,439	0,058	0,066	0,500	1,478
230	0,748	0,222	0,201	0,167	0,058	0,066	0,500	0,444
231	0,575	0,278	0,182	0,107	0,058	0,066	0,500	0,556
232	0,732	0,345	0,231	0,080	0,058	0,066	0,500	0,690
233	2,221	0,741	0,616	0,364	0,058	0,066	0,500	1,482
234	1,219	0,386	0,313	0,208	0,058	0,066	0,500	0,772
235	1,854	0,551	0,347	0,322	0,058	0,066	0,500	1,102
236	1,586	0,798	0,494	0,272	0,058	0,066	0,500	1,596
237	0,986	0,336	0,133	0,071	0,058	0,066	0,500	0,672
238	2,041	1,279	0,502	0,267	0,058	0,066	0,500	2,558
239	1,285	0,612	0,539	0,188	0,058	0,066	0,500	1,224
240	1,059	0,324	0,257	0,139	0,058	0,066	0,500	0,648

---