UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Área de concentração: Mestrado Profissionalizante em Biotecnologia

LYGIA BERNARDINO PEREIRA

**Validação de kit imunocromatográfico rápido para diagnóstico da
doença de Chagas**

Ribeirão Preto

2018

LYGIA BERNARDINO PEREIRA

**Validação de kit imunocromatográfico rápido para diagnóstico da
doença de Chagas**

Versão Original

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado Profissional em Hemoterapia e
Biotecnologia, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Simone
Kashima Haddad

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pereira, Lygia Bernardino

Validação de kit imunocromatográfico rápido para diagnóstico da doença de Chagas. Ribeirão Preto, 2018.

84 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Kashima Haddad, Simone.

Nome: PEREIRA, Lygia Bernardino

Título: Validação de kit imunocromatográfico rápido para diagnóstico da doença de Chagas.

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

*Aos meus pais, Marx e Cristina,
que sempre incentivaram meus
estudos. Por todo o amor,
conselhos, orações e paciência.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, me dando forças para que eu não desistisse.

À minha orientadora, Professora Dra. Simone Kashima Haddad, por ter acreditado em mim e no meu trabalho, pelos ensinamentos e oportunidades. Pela preocupação em me orientar o mais próximo possível, e pela constante disponibilidade em me auxiliar.

À minha família. Aos meus pais, Marx e Cristina, pelo apoio e amor incondicionais. Aos meus irmãos, Lucas, Luíza e Luciana, pelos momentos de diversão, pelas risadas e pela compreensão nos momentos mais difíceis. A todos os meus parentes, pelo constante incentivo.

Ao meu namorado Gabriel, por todo amor, ajuda, compreensão e apoio constantes.

Ao Dr. Wagner Maricondi, presidente da WAMA Diagnóstica, e ao João Carlos Montagnini Jr., diretor geral, pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional, e pela confiança em meu trabalho.

À equipe de Pesquisa e Desenvolvimento e OEM da WAMA. Ao Dr. Carlos Alberto Mestriner e Maria Angélica de Camargo, gestores de Pesquisa e Desenvolvimento da WAMA Suíça e WAMA Brasil, por confiarem em mim e me auxiliarem nesse trabalho. Às minhas colegas, Jéssica, Ana Luísa, Josiane e Maria Isabel (não mais na equipe, mas sempre presente), pelo apoio e ajuda nos momentos difíceis, e pelas risadas que tornam tudo mais leve.

À Vanderléia Bárbaro Valente, gerente do Laboratório de Sorologia do Hemocentro de Ribeirão Preto, por disponibilizar o laboratório para realização de alguns experimentos, e por auxiliar no desenho dos mesmos. Agradeço também à equipe do Laboratório de Sorologia, em especial à Rita e Larissa, pela ajuda na realização dos testes.

Ao Professor Dr. Edson Zangiacomi Martinez e Rochele Azevedo França, pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao meu cunhado, Tulio, pelas conversas, ajuda com documentos, caronas e hospedagem.

Aos meus amigos de anos, Carla, Paula, Daisy, Alini, Laís, Natália, Thássia, Lahis, Pedro, Helen. Obrigada pelas risadas, palavras de apoio e pela amizade que nunca muda.

A todos os professores que contribuíram para minha formação durante esse mestrado.

A todos os funcionários da WAMA, pelo apoio, amizade e ajuda.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia, por todo auxílio.

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo, pela excelência no ensino e pesquisa.

*“Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo
para todo o propósito debaixo do céu”*

Eclesiastes 3:1

RESUMO

PEREIRA, L.B. **Validação de kit imunocromatográfico rápido para detecção da doença de Chagas**. 2018. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A doença de Chagas acomete entre 6 e 7 milhões de pessoas ao redor do mundo e acredita-se que a mesma seja responsável por 10.000 mortes/ano. A disponibilidade limitada de testes sorológicos sensíveis, específicos e rápidos para a doença dificulta o diagnóstico e o início precoce do tratamento em áreas endêmicas e não endêmicas. Neste estudo, realizou-se a validação de um teste imunocromatográfico rápido para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG (Imuno-Rápido Chagas, WAMA Diagnóstica). O desempenho do kit foi comparado ao de um kit comercial que utiliza a mesma metodologia (*Comercial A*) e às técnicas de ELISA e imunofluorescência indireta (IFI). Foram testadas 664 amostras de soro, as quais foram classificadas como reagentes e não reagentes considerando os resultados concordantes entre as metodologias de ELISA e IFI. O kit Imuno-Rápido Chagas apresentou sensibilidade de 98,5% e especificidade de 99,7%. Utilizando uma amostragem menor ($n = 395$), o desempenho desse teste rápido foi comparado ao do kit *Comercial A*. Nesta análise, o kit Imuno-Rápido Chagas apresentou uma sensibilidade de 98,1% e especificidade de 99,6%, ao passo que os valores de sensibilidade e especificidade encontrados para o kit *Comercial A* foram 98,7% e 99,6%, respectivamente. Por utilizarem antígenos recombinantes em suas composições e serem realizados em uma única etapa, os testes imunocromatográficos apresentaram sensibilidade inferior aos testes sorológicos convencionais. O kit Imuno-Rápido Chagas apresentou sensibilidade inferior ao kit *Comercial A*, o que pode ser explicado pelo volume menor de amostra utilizado no primeiro kit e pela reatividade do antígeno recombinante impregnado nos testes. Quando comparado com a literatura, nota-se que o kit Imuno-Rápido Chagas apresentou desempenho similar ou superior ao de outros testes rápidos disponíveis no mercado (SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2014). A sensibilidade analítica do teste avaliado foi de 0,235 UI/mL, e o kit mostrou ser mais específico frente a amostras reagentes para leishmaniose tegumentar do que a técnica de IFI. O teste manteve seu bom funcionamento oito meses após sua fabricação e após ter sofrido estresse de temperatura. Os resultados desse estudo sugerem que o kit Imuno-Rápido Chagas é capaz de detectar anticorpos da classe IgG anti-*T. cruzi*, apresentando valores de sensibilidade e especificidade comparáveis aos de outros testes comerciais. Sendo assim, o kit pode ser utilizado para auxiliar no diagnóstico da fase crônica da doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas; teste imunocromatográfico rápido; validação.

ABSTRACT

PEREIRA, L.B. **Validation of a rapid immunochromatographic kit for diagnosis of Chagas disease.** 2018. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Around 6 to 7 million people are infected by Chagas disease worldwide, and it is believed that this disease is responsible for 10,000 deaths/year. The lack of sensitive, specific and rapid serological tests for the disease hampers the diagnosis and the start of early treatment in endemic and non-endemic areas. This study validated a rapid immunocromatographic test for detection of IgG antibodies anti-*T. cruzi* (Imuno-Rápido Chagas, WAMA Diagnóstica). The kit's performance was compared to a commercial kit that uses the same methodology (*Comercial A*), to ELISA and to Indirect Immunofluorescence technique (IFI). A total of 664 serum specimens were tested, which were classified as reactive or non-reactive according to concordant results between ELISA and IFI. The sensitivity and specificity of Imuno-Rápido Chagas kit were 98.5% and 99.7%, respectively. The performance of this rapid test was compared to *Comercial A* using a smaller sampling (n = 395). At this analysis, the sensitivity and specificity of Imuno-Rápido Chagas kit were 98.1% and 99.6%, while the sensitivity and specificity of *Comercial A* kit were 98.7% and 99.6%, respectively. The immunochromatographic tests have shown lower sensitivity compared to conventional serological tests probably because they use recombinant antigens in their system and are performed in one-step. The Imuno-Rápido Chagas kit has shown lower sensitivity than *Comercial A* kit, which can be explained by the smaller amount of sample that is used in the first kit and by reactivity of the recombinant antigens used in the tests. Once compared to literature, Imuno-Rápido Chagas kit had the same or better performance than other commercial rapid tests available in the market (SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2014). The analytical sensitivity of the evaluated test in this study was 0.235 IU/mL, and the kit has shown a higher specificity than IFI regarding cutaneous leishmaniasis reactive samples. The test has maintained its good performance eight months after its manufacturing and after a temperature stress. The results of this study indicate that Imuno-Rápido Chagas kit is able to detect IgG antibodies anti-*T. cruzi*, showing sensitivity and specificity values comparable to other commercial tests. Therefore, the kit can be used to help on diagnosis of chronic phase of Chagas disease.

Key words: Chagas disease; rapid immunocromatographic test; validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho esquemático de um teste rápido.....	12
Figura 2 - Ciclo de vida do parasita Trypanosoma cruzi.	17
Figura 3 - Modelo proposto por Tarleton (2003) para explicar a progressão da doença de Chagas em diferentes indivíduos infectados.	19
Figura 4 - Exemplos de resultados do teste. À esquerda, exemplo de um resultado positivo. À direita, exemplo de um resultado negativo.	26
Figura 5 - Resultado do teste de estabilidade acelerada. Na linha superior encontram-se os testes armazenados em temperatura ideal (2 a 30°C) e na linha inferior os testes submetidos a estresse de temperatura por 3 dias. A identificação das amostras encontra-se acima da figura.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados obtidos para as amostras testadas utilizando a técnica de ELISA.	33
Tabela 2 - Resultados obtidos para as amostras testadas utilizando a técnica de imunofluorescência indireta.	34
Tabela 3 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do kit Imuno-Rápido Chagas para detecção de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> utilizando-se as técnicas de ELISA e IFI como testes referência.	35
Tabela 4 - Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, coeficiente de Youden e prevalência aparente obtidos para o kit Imuno-Rápido Chagas considerando um IC de 95%.	36
Tabela 5 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do kit Comercial A para detecção de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> utilizando-se as técnicas de ELISA e IFI como testes referência.	37
Tabela 6 - Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, coeficiente de Youden e prevalência aparente para o kit Comercial A, considerando um IC de 95%.	37
Tabela 7 - Valores de índice kappa e suas interpretações.	38
Tabela 8 - Resultados do teste de sensibilidade analítica do kit Imuno-Rápido Chagas. Foram realizadas diluições seriadas do padrão internacional quantificado para anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> II em plasma humano (NIBSC code 09/186) e as mesmas foram testadas em oito réplicas.	39
Tabela 9 - Resultados da análise de reprodutibilidade do kit Imuno-Rápido Chagas. Foram testadas dez amostras de soro reagentes para anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> e dez amostras não reagentes utilizando três lotes diferentes do kit. Os testes foram realizados em dias diferentes.	40
Tabela 10 - Resultados da análise de repetibilidade do kit Imuno-Rápido Chagas. Foram testadas cinco amostras de soro reagentes para anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> e cinco amostras não reagentes em quintuplicata sob as mesmas condições (mesmo lote, operador e dia de teste).	41
Tabela 11 - Resultados do teste de estabilidade acelerada. Foram testados kits mantidos a 56°C por um, dois e três dias, e um kit armazenado em temperatura ideal (2 a 30°C).	42
Tabela 12 - Resultados do teste de estabilidade em tempo real do kit Imuno-Rápido Chagas. Os testes foram realizados bimestralmente desde a data de fabricação do kit (agosto/2017) até abril/2018. Foram selecionadas três amostras de soro reagentes para anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> e três amostras não reagentes para esse estudo.	44

Tabela 13 - Resultados da análise de reação cruzada do kit Imuno-Rápido Chagas. Foram testadas 20 amostras de soro reagentes para leishmaniose e sete amostras reagentes para toxoplasmose. Todas as amostras eram não reagentes para anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> . Os resultados foram comparados aos obtidos utilizando a técnica de imunofluorescência indireta.	44
Tabela 14- Listagem das amostras utilizadas para análise de sensibilidade e especificidade clínicas e os resultados obtidos utilizando as metodologias de IFI e ELISA e os kits Imuno-Rápido Chagas e Comercial A.	60
Tabela 15 - Descrição das amostras utilizadas na análise de interferentes e os resultados obtidos utilizando o kit Imuno-Rápido Chagas e a técnica de imunofluorescência indireta.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ELISA: *Enzyme linked immunossorbent assay*

HAI: Hemaglutinação indireta

IC: Intervalo de confiança

IFI: Imunofluorescência indireta

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

k: Coeficiente *kappa*

NIBSC: *National Institute for Biological Standards and Control*

NR: Não reagente

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PNCQ: Programa Nacional de Controle de Qualidade

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

Reag: Reagente

UI: Unidade Internacional

VPN: Valor preditivo negativo

VPP: Valor preditivo positivo

WB: *Western Blot*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Testes de fluxo lateral para diagnóstico	11
1.2 Doença de Chagas	15
1.3 Diagnóstico da doença de Chagas	19
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Casuística	25
3.2 Testes com o kit Imuno-Rápido Chagas	25
3.3 Testes com kit imunocromatográfico disponível no mercado	26
3.4 Testes com a técnica de ELISA	26
3.5 Testes com a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)	27
3.6 Análise estatística diagnóstica	27
3.7 Controle de qualidade do kit Imuno-Rápido Chagas	29
3.7.1 Análise da sensibilidade analítica do kit Imuno-Rápido Chagas	29
3.7.2 Teste de reprodutibilidade	30
3.7.3 Teste de repetibilidade	30
3.7.4 Análise de estabilidade em tempo real e acelerada	30
3.7.4.1 Estabilidade acelerada	30
3.7.4.2 Estabilidade em tempo real	31
3.8 Análise de reação cruzada	31
4. RESULTADOS	33
4.1 Validação do teste	33
4.1.1. Testes realizados com a técnica de ELISA	33
4.1.2 Testes realizados com a técnica de imunofluorescência indireta	33
4.1.3 Análise estatística diagnóstica– Imuno-rápido Chagas	35
4.1.4 Análise estatística diagnóstica – <i>Comercial A</i>	36
4.1.5 Cálculo coeficiente <i>kappa</i> entre os kits Imuno-Rápido Chagas e <i>Comercial A</i>	38
4.2 Controle de Qualidade do teste	38
4.2.1 Teste de Sensibilidade Analítica	38
4.2.2 Teste de reprodutibilidade	39
4.2.3 Teste de repetibilidade	41
4.2.4 Teste de estabilidade acelerada	42
4.2.5 Teste de estabilidade em tempo real	43
4.2.6 Análise de reação cruzada	44

5. DISCUSSÃO.....	47
5.1 Análise estatística diagnóstica.....	47
5.2 Controle de qualidade do kit Imuno-Rápido Chagas	50
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICE A – Listagem das amostras utilizadas para análise de sensibilidade e especificidade clínicas.....	60
APÊNDICE B – Amostras utilizadas na análise de interferentes e seus resultados	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 Testes de fluxo lateral para diagnóstico

As tecnologias diagnósticas visam tanto o desenvolvimento contínuo de métodos altamente precisos, que requerem infraestrutura e uma abordagem centralizada, quanto o desenvolvimento de tecnologias menos precisas que possam ser utilizadas de forma descentralizada (*point-of-care*), necessitando de infraestrutura mínima para sua execução. Um exemplo dessa última tecnologia seria os testes rápidos para diagnóstico (O'FARRELL, 2013).

Considerando que os testes rápidos para diagnóstico apresentam baixo custo de fabricação, são portáteis e de fácil execução, o desenvolvimento e a comercialização desses testes são bem intensos hoje. Existem diferentes formatos de testes rápidos para diagnósticos, tais como dispositivos de imunoconcentração, testes baseados em aglutinação, baseados em imunocromatografia e de fase sólida (BRANSON, 2003; ROSEN, 2008; KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

Os testes de fluxo lateral são um formato de teste rápido fundamentados no método imunocromatográfico. Esses testes são utilizados para detecção e/ou quantificação de analitos em misturas complexas, e os resultados são obtidos entre 5 e 30 minutos. Os testes imunocromatográficos rápidos são importantes para efeitos diagnósticos, tais como infecção ou contaminação por certos patógenos, medicamentos, drogas de abuso, metabólitos e hormônios. Além dos diagnósticos clínicos, os testes de fluxo lateral são aplicados na veterinária, agricultura, indústria de alimentos, segurança e qualidade ambiental, ensaios industriais e diagnóstico molecular (O'FARRELL, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Os baixos custos para desenvolvimento e a facilidade de produção desses testes tem resultado na expansão de sua aplicação em vários setores nos quais testes rápidos são requisitados. Os testes de fluxo lateral são amplamente utilizados em hospitais, consultórios médicos e laboratórios clínicos para detecções quantitativas e qualitativas de antígenos e anticorpos específicos, como também de produtos de amplificação gênica. Uma variedade de amostras biológicas pode ser testada utilizando os testes de fluxo lateral, incluindo soro, plasma, sangue total, urina, saliva, suor, e outros fluidos (KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

Tradicionalmente, os testes imunocromatográficos rápidos são compostos por uma variedade de membranas, as quais são impregnadas com reagentes secos. As membranas são

sobrepostas umas sobre as outras e montadas sobre um cartão plástico para melhorar a estabilidade e facilitar o manuseio. A interação entre os diversos componentes determinará o desempenho e o correto funcionamento do teste (O'FARRELL, 2009; SHARMA et al., 2015).

A composição básica de um teste rápido pode ser visualizada na figura 1:

Figura 1 - Desenho esquemático de um teste rápido.

Fonte: Adaptado de O'FARRELL (2013).

Como apresentado na figura 1, a amostra é aplicada em uma extremidade da tira, denominada base de amostra, a qual é impregnada com soluções tamponantes e surfactantes que tornam a amostra compatível com o restante do teste. A base de amostra garante que o analito presente na amostra será capaz de se ligar aos reagentes de captura do conjugado e na membrana. A amostra tratada migra para a base do conjugado, na qual o reagente de detecção está imobilizado. O reagente de detecção ou conjugado é um complexo formado por anticorpos ou antígenos ligados a partículas capazes de gerar um sinal, como por exemplo ouro coloidal, esferas de látex coloridas e partículas fluorescentes. A amostra solubiliza o conjugado seco e o analito presente na amostra interage com o conjugado, formando um complexo que migra para a próxima seção da tira, a matriz reacional. A matriz reacional consiste em uma membrana hidrofóbica porosa de nitrocelulose ou acetato de celulose, na qual anticorpos anti-analito ou antígenos são imobilizados em linhas (bandas teste e controle). A função dessas bandas é reagir com o complexo conjugado-analito. O reconhecimento do analito da amostra resulta em resposta apropriada na banda teste, ao passo que o aparecimento da banda controle garante a funcionalidade do teste. O excesso de reagentes flui ao longo do teste pela força de capilaridade do material da tira e, para manter o fluxo em uma única

direção, a base absorvente é acrescentada ao final da tira. O papel desta última base é absorver o excesso de reagentes e prevenir refluxo do líquido. O resultado, representado pela presença ou ausência da banda teste, pode ser visualizado a olho nu ou com o uso de um leitor. Para que múltiplos analitos sejam testados simultaneamente sob as mesmas condições, bandas teste contendo anticorpos ou antígenos específicos a diferentes analitos podem ser imobilizados na mesma tira teste (KOCZULA; GALLOTTA, 2016; SHARMA et al., 2015).

Podem ser distinguidos dois formatos de testes de fluxo lateral: direto (sanduíche) e competitivo. O formato sanduíche é utilizado para analitos com alto peso molecular com múltiplos determinantes antigênicos. Este formato pode ser utilizado para detecção de anticorpo ou antígeno. No caso de detecção de antígeno, um conjugado contendo um anticorpo específico para o antígeno é aplicado na base do conjugado e outro anticorpo específico para o antígeno é aplicado na banda teste. Assim, o antígeno presente na amostra interage com o conjugado e esse complexo se liga aos anticorpos impregnados na área teste da membrana reacional. Por outro lado, para detecção de anticorpo, utiliza-se um conjugado contendo um antígeno reconhecido pelo anticorpo e outro antígeno na banda teste. Os resultados obtidos pelo formato sanduíche são presença da banda teste (resultado positivo), ou ausência da mesma (resultado negativo) (O'FARRELL, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014; KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

Já o formato competitivo é utilizado para compostos de baixo peso molecular, os quais não podem se ligar a dois anticorpos simultaneamente. Nesse tipo de teste, o analito bloqueia os sítios de ligação dos anticorpos ou antígenos impregnados como banda teste, impedindo a interação entre eles e o conjugado. Sendo assim, um resultado positivo é indicado pela ausência de banda teste, ao passo que o aparecimento da banda teste indica um resultado negativo. O formato competitivo também pode detectar antígeno ou anticorpo. Para detecção de antígeno, utiliza-se um conjugado contendo um anticorpo específico para o antígeno e o mesmo antígeno a ser detectado é aplicado na banda teste. Assim, o antígeno presente na amostra e o da banda teste competem pelo mesmo conjugado. No caso de detecção de anticorpo, um antígeno conjugado é aplicado na base do conjugado e um anticorpo que reconheça especificamente o antígeno é aplicado na banda teste. Após aplicação da amostra, o analito e o conjugado competem pela ligação ao anticorpo da banda teste (O'FARRELL, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014; KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

Em 2015, o mercado de testes de fluxo lateral foi estimado em US\$ 4,56 bilhões. Com uma taxa de crescimento anual de 8,3%, o mercado deve crescer para US\$ 6,78 bilhões até 2020 (MARKETSANDMARKETS, 2016).

O segmento de testes de fluxo lateral na área médica é geralmente visto como o mais lucrativo porque globalmente existe uma demanda muito alta para descentralização dos testes diagnósticos. Ao analisar os dados de 2010, os testes de fluxo lateral utilizados na área médica geraram US\$ 2.990 milhões de receita e representaram 89% do mercado mundial de testes rápidos (ROSEN, 2009).

Com o aprimoramento e desenvolvimento da técnica, atualmente os testes de fluxo lateral apresentam alta sensibilidade e especificidade, com desempenho comparável ao teste imunoenzimático (ELISA, do inglês “*enzyme linked immunossorbent assay*”). Os testes rápidos apresentam vantagens em relação à técnica de ELISA, como seu baixo custo (tanto de produção quanto de venda), boa estabilidade, portabilidade, a possibilidade do uso de diferentes tipos de amostras e o transporte e armazenamento dos kits poder ser realizado em temperatura ambiente (PONCE et al., 2005; BRASIL MS, 2007; O’FARRELL, 2007; SHARMA et al., 2015).

Além dessas vantagens, os testes de fluxo lateral são realizados em única etapa e apresentam resultados fáceis de serem interpretados, dispensando a necessidade de profissionais especializados para realização do teste. Assim, esses testes permitem o diagnóstico de populações localizadas em áreas de difícil acesso, nas quais a infraestrutura laboratorial é mínima ou inexistente. Além disso, o uso dessa técnica reduz a sobrecarga dos laboratórios centrais, diminuindo também as despesas relacionadas ao transporte de amostras e encaminhamento dos resultados aos laboratórios (PONCE et al., 2005; BRASIL MS, 2007; O’FARRELL, 2007).

Outra característica muito importante dos testes imunocromatográficos rápidos que favorece sua ampla utilização é a obtenção dos resultados em poucos minutos. Vários programas de saúde brasileiros têm utilizado esses testes, permitindo que no mesmo atendimento o paciente realize o teste, tenha conhecimento do resultado, inicie a terapêutica e receba as orientações necessárias. Algumas populações como trabalhadores itinerantes, profissionais do sexo, usuários de drogas ilícitas e moradores em locais de difícil acesso ao sistema de saúde puderam ser triadas para certas doenças infecciosas graças ao uso dos testes de fluxo lateral (BRASIL MS, 2007; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

1.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas, conhecida como tripanossomíase americana, é uma das consequências da infecção humana causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita ao redor do mundo, principalmente em 21 países da América Latina. Acredita-se que a doença seja responsável por aproximadamente 10.000 mortes/ano (BRASIL MS, 2009; WHO, 2010, 2015, 2017).

Estima-se que menos de 1% da população infectada esteja em tratamento, de acordo com um cálculo realizado a partir dos dados de pessoas portadoras de Chagas e da demanda anual de medicamentos contra a doença (DRUG FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2013).

Segundo LEE e colaboradores (2013), o gasto mundial médio com tratamento de um paciente chagásico crônico mais o custo de perda produtiva é igual a US\$ 4.660/ano. Dos países da América Latina, o Brasil apresenta os maiores custos relacionados à assistência médica para esse tipo de paciente - mais de US\$ 129 milhões por ano. Além disso, o Brasil apresenta também o maior custo de perda de produtividade anual da América Latina – superior a US\$ 1,7 bilhões.

A transmissão humana da doença geralmente acontece através das fezes/urina dos triatomíneos infectados, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Esses insetos vivem principalmente em áreas rurais, e se adaptaram a ambientes domésticos rústicos, sendo encontrados em rachaduras de paredes e tetos de palha. Os triatomíneos se alimentam de sangue de mamíferos, incluindo humanos (BRASIL MS, 2009; BERN, 2015; WHO, 2015).

Em geral, ao picarem os mamíferos, esses insetos defecam após o repasto, eliminando formas infectantes de tripomastigotas que penetram pelo orifício da picada ou pelo ato de coçar. Durante o ciclo de vida, o parasita *T. cruzi* assume diferentes formas de desenvolvimento, alternando entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Ao picar o mamífero, o triatomíneo libera tripomastigotas metacíclicas nas fezes, as quais infectam o hospedeiro e invadem suas células, onde se transformam em amastigotas, que se multiplicam no ambiente intracelular. As formas amastigotas se transformam em tripomastigotas, que rompem as células e atingem a corrente sanguínea, podendo infectar novas células ou permanecer na corrente sanguínea, infectando o inseto no momento da picada. No inseto, a forma tripomastigota sanguínea evolui para duas formas replicativas, epimastigotas e esferomastigotas, que proliferam, e quando alcançam o reto, se diferenciam na forma

infectante tripomastigota metacíclica, completando o ciclo de vida. As formas amastigotas intracelulares podem persistir dormentes no organismo do hospedeiro por décadas, escondidas em células musculares sem causar danos significativos aos tecidos. O ciclo de vida do *T. cruzi* pode ser visualizado na figura 2. (TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006; RASSI JR.; RASSI; REZENDE, 2012; MARTINS-MELO et al., 2014).

Além da transmissão vetorial, a doença de Chagas também pode ser transmitida via transfusão sanguínea, transplacentária (congenita) e oral (ingestão de alimentos e bebidas contaminados pelo parasita). Outros mecanismos de transmissão menos comuns envolvem manejo de animais infectados, transplante de órgãos sólidos, acidentes de laboratório e leite materno (BRASIL MS, 2009; WHO, 2015; CHATELAIN, 2017).

Por milhares de anos, a doença de Chagas esteve restrita principalmente a América Latina, onde era endêmica. Nas últimas décadas, devido ao intenso fluxo migratório de pessoas infectadas de áreas endêmicas para áreas não endêmicas, associado a mudanças na distribuição ecogeográfica dos insetos vetores, a doença de Chagas tem sido detectada em países como Canadá, Estados Unidos, Austrália, Itália, Suíça, Espanha e França. Em áreas não endêmicas, as principais formas de transmissão do *T. cruzi* são a rota congênita, transfusões de sangue e/ou transplante de órgãos contaminados pelo parasita. Como medidas para conter a transmissão da doença, alguns países realizam testes sorológicos para doença de Chagas durante o pré-natal e nos recém-nascidos (com acompanhamento até um ano de idade), além de incluírem esses testes como rotina da análise de bolsas de sangue (WHO, 2010, 2015; DRUG FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2013; BERN, 2015; BALOUZ, AGÜERO, BUSCAGLIA, 2017).

Figura 2 - Ciclo de vida do parasita *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Adaptado de CDC (Centers for Disease Control and Prevention) ([200-?]).

Através de estudos bioquímicos, biológicos e biomoleculares, notou-se que os isolados de *T. cruzi* eram muito heterogêneos, o que pode explicar as manifestações clínicas variadas da doença de Chagas e as diferenças de morbidade e mortalidade dependendo da região geográfica. De acordo com suas características (área endêmica, resistência a medicamentos, por exemplo), os parasitas foram classificados em seis grupos: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI. O subtipo *T. cruzi* II, por exemplo, está associado ao ciclo doméstico e é endêmico dos países da América do Sul, como Brasil e Argentina (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010; WHO, 2011; ZINGALES et al., 2012).

A doença de Chagas se manifesta em duas fases: a fase aguda e a fase crônica.

A fase aguda dura aproximadamente dois meses e apresenta alta parasitemia sanguínea. De acordo com a região anatômica de entrada do parasita no corpo, o indivíduo pode apresentar uma lesão de pele (chagoma) ou inchaço arroxeadado em uma das pálpebras

(sinal de Romaña) com as glândulas linfáticas locais inchadas e febre por várias semanas. Nessa fase, a maioria dos casos é assintomática ou apresenta sintomas inespecíficos, como dor de cabeça, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, tosse, aumento do fígado, entre outros. Na fase aguda, os sintomas podem desaparecer espontaneamente e evoluir para a fase crônica, ou avançar para formas agudas graves que podem levar ao óbito. A doença é mais severa em crianças menores de 2 anos, idosos, imunossuprimidos ou em indivíduos infectados por um número muito alto de parasitas, como em surtos de origem alimentar (BRASIL MS, 2009; WHO, 2010).

Por outro lado, na fase crônica, a maioria dos parasitas se encontra dentro de tecidos alvo, como o coração e músculos digestivos. Durante esse período, diferentes formas clínicas podem ser observadas: indeterminada ou forma assintomática (mais comum; encontrada logo após a fase aguda e é observada ao longo da vida da maioria dos pacientes); forma cardíaca (ocorre em até 30% dos pacientes; desordens no sistema de condução elétrico cardíaco, arritmia, problemas no músculo cardíaco e embolismos); forma de lesões digestivas (aumento do esôfago e cólon); e forma mista (cardíaca e digestiva; acomete até 10% dos pacientes) (BRASIL MS, 2009; WHO, 2010).

Durante a fase aguda, o parasita se prolifera ativamente e invade vários tipos celulares do hospedeiro. O sistema imune do indivíduo é então ativado, reduzindo significativamente a concentração de parasita circulante e controlando, por consequência, a infecção. Essa resposta imunológica se caracteriza pela produção de células T CD4+ e CD8+, com consequente liberação de citocinas (como interferon gama), além da produção de anticorpos específicos contra o parasita. Provavelmente respostas semelhantes a essa são necessárias para manter o parasita sob controle durante a fase crônica da infecção (TARLETON, 2003; CHATELAIN, 2017).

A maioria dos indivíduos gera respostas efetivas durante a fase aguda e assim controlam a infecção. Todavia, falhas no controle do processo infeccioso nesse ponto, ou a perda de habilidade em manter essas respostas nas fases seguintes da infecção, resultam em altos níveis de parasita circulante e risco de morte (TARLETON, 2003; CHATELAIN, 2017).

Todos os pacientes chagásicos crônicos apresentam uma concentração de parasita, porém apenas uma porcentagem desses desenvolvem a forma sintomática da doença. Para tentar elucidar tal questão, Tarleton (2003) propôs um modelo relacionando a severidade da doença e a concentração de parasita ao longo do tempo (Figura 3). Como já comentado, a fase aguda da doença é caracterizada por uma alta carga parasitária (destacado em verde), a qual é reduzida a níveis baixos/indetectáveis com a ativação da resposta imunológica. A doença

evolui então para a fase crônica, sendo que a severidade da mesma depende do tempo desde o início da infecção e da eficácia do sistema imune do hospedeiro. Cerca de 30 a 40% dos pacientes chagásicos na fase crônica apresentam manifestações clínicas, como cardiopatia e megacólon; o restante dos pacientes permanece assintomático (forma indeterminada da doença) (TARLETON, 2003; CHATELAIN, 2017).

Figura 3 - Modelo proposto por Tarleton (2003) para explicar a progressão da doença de Chagas em diferentes indivíduos infectados.

Fonte: Adaptado de CHATELAIN (2017).

Apenas duas drogas estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas – benznidazol e nifurtimox. Ambas são consideradas eficientes na fase aguda, em alguns casos no início da fase crônica e na prevenção da transmissão congênita em crianças nascidas de mães infectadas que foram tratadas antes da gravidez. Devido a toxicidade dos medicamentos, o tratamento é contraindicado durante a gravidez. Dentre os efeitos colaterais das drogas estão insuficiências renal e hepática, dermatite e efeitos gastrointestinais, como náusea e vômito (BRASIL, 2009; FABBRO et al, 2014; BERN, 2015; PORRÁS et al, 2015).

1.3 Diagnóstico da doença de Chagas

Fase aguda

O diagnóstico da doença de Chagas nessa fase pode ser parasitológico, sorológico ou molecular.

Durante a fase aguda da doença de Chagas, um grande número de parasitas está presente no sangue periférico e pode ser detectado por testes parasitológicos diretos. As preparações de lâminas coradas de gota espessa ou esfregaços permitem a observação de características morfológicas do *T. cruzi*, diferenciando-o de outros parasitas (WHO, 2002; BRASIL MS, 2009; GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009).

Caso os exames direto de sangue fresco apresentem resultados negativos, mas suspeita-se que o paciente esteja na fase aguda da doença, é recomendado a realização de testes de concentração (microhematócrito ou teste de Strout). Nos casos sintomáticos com duração maior que trinta dias, para testes diretos negativos, testes de concentração devem ser a primeira escolha, visto que a parasitemia começa a declinar nessa fase (WHO, 2002; BRASIL MS, 2005; GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009).

No caso dos exames sorológicos, realiza-se a busca por anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM, particularmente quando associada a alterações clínicas e epidemiológicas sugestivas. A dificuldade para a realização de testes sorológicos em pacientes na fase aguda se deve à falta de testes comerciais registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e de controles positivos para IgM. Alguns laboratórios utilizam os testes de imunofluorescência indireta com pesquisa de IgM (IFI-IgM), *Western Blot* (WB) e, eventualmente, ELISA-IgM (BRASIL MS, 2005).

A fase aguda da doença de Chagas pode ser diagnosticada pela técnica molecular reação em cadeia da polimerase (*PCR*, em inglês), a qual apresenta sensibilidade dependente da parasitemia do paciente. Segundo o Ministério da Saúde (2009), o diagnóstico molecular da doença de Chagas por meio da *PCR* é realizado apenas por centros colaboradores em caráter experimental, até que os protocolos sejam definidos e os procedimentos operacionais padronizados (WHO, 2002).

Fase crônica

A fase crônica da doença de Chagas é caracterizada por níveis de parasitas circulantes inferiores ao limite de detecção microscópica e também pelo aparecimento de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG. O diagnóstico nessa fase é baseado primeiramente em testes convencionais sorológicos como hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA), e em métodos parasitológicos indiretos (xenodiagnóstico e hemocultura). Apesar de altamente específicos, esses testes parasitológicos apresentam baixa sensibilidade, tornando o diagnóstico durante a fase crônica essencialmente sorológico (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009).

Na maioria dos testes convencionais, uma mistura complexa de antígenos do parasita (HAI e ELISA) ou o parasita inteiro (IFI) são utilizados. Isso aumenta a probabilidade de detecção da infecção, mesmo quando a concentração de anticorpos é baixa. Apesar de altamente sensíveis, a especificidade desses testes é baixa pois resultados falso-positivos podem ocorrer devido a reações cruzadas antigênicas entre *T. cruzi* e outros parasitas, principalmente os tripanosomatídeos como *Leishmania* spp. e *Trypanosoma rangeli*. Esses protozoários podem apresentar muitas similaridades genéticas com os antígenos de *T. cruzi* e os pacientes acometidos por esses parasitas podem apresentar anticorpos que reconheçam epítomos dos antígenos utilizados nos testes sorológicos para doença de Chagas (WHO, 2002; GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009; PEREIRA et al, 2012; DUARTE et al, 2014).

De acordo com as orientações da Organização Mundial da Saúde (2007) e do Ministério da Saúde (2009), o diagnóstico durante a fase crônica deve ser realizado pelo uso de um teste com alta sensibilidade (ELISA com antígeno total ou frações semi-purificadas do parasita, IFI ou HAI) em paralelo com outro teste que apresente alta especificidade (ELISA, utilizando antígenos recombinantes específicos de *T. cruzi*). Caso os resultados não concordem, o diagnóstico é considerado inconclusivo. Nestes casos, as amostras devem ser testadas novamente pelos mesmos métodos. Caso a discrepância de resultados persista, o Ministério da Saúde recomenda que as amostras com resultados inconclusivos persistentes sejam enviadas a laboratórios de referência, onde serão testadas utilizando outros testes sorológicos e métodos mais complexos, como *Western blot* (WHO 2007; BRASIL MS 2009; GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009).

Os testes convencionais citados acima requerem equipamentos de laboratório, recursos humanos treinados para realização dos testes, geladeira para armazenamento dos kits e os resultados podem demorar vários dias, de modo que são necessárias pelo menos duas visitas do paciente ao centro de saúde para ser diagnosticado. Além disso, esses testes não são ideais para a triagem de um grande número de amostras, como ocorre em levantamentos epidemiológicos (VERANI et al., 2009; REITHINGER et al., 2010; EGÜEZ et al, 2017).

Existem testes sorológicos não-convencionais que auxiliam no diagnóstico da doença de Chagas. Eles utilizam proteínas recombinantes, antígenos purificados, ou peptídeos sintéticos. Esses reagentes foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a especificidade do diagnóstico sorológico e evitar reações cruzadas com outras doenças parasitárias como leishmaniose. Nesses testes, o antígeno é imobilizado em matrizes diferentes, como tiras testes e partículas magnéticas (do inglês, *beads*). Apesar desses testes apresentarem alta

especificidade, a sensibilidade geralmente é menor que a sorologia convencional (WHO, 2002).

As principais vantagens dos testes não-convencionais são a simplicidade (teste realizado em uma única etapa) e o curto período de tempo necessário para a execução e leitura do resultado (WHO, 2002).

Dentre os testes não convencionais, encontram-se os testes de fluxo lateral baseados no uso de antígenos recombinantes, os quais têm sido desenvolvidos com o intuito de oferecer uma técnica diagnóstica precisa e simples. Os testes imunocromatográficos rápidos não necessitam de equipamentos elétricos, podem ser armazenados em temperatura ambiente, fornecem os resultados em poucos minutos e podem ser realizados por qualquer pessoa capacitada que tenha recebido treinamento. Essas características são fundamentais para implantação de testes em regiões remotas, onde o acesso de agentes de saúde é difícil e o suprimento de energia elétrica pode ser instável ou inexistente (VERANI et al., 2009; REITHINGER et al., 2010; EGÜEZ et al., 2017).

Além disso, um teste diagnóstico rápido, sensível e específico para detectar a doença de Chagas seria muito importante para levantamentos epidemiológicos e campanhas de intervenção, como também para monitoramento durante os surtos. Os resultados podem ser lidos rapidamente e as medidas de controle podem ser implementadas *in situ* (VERANI et al., 2009; REITHINGER et al., 2010).

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo validar um kit imunocromatográfico rápido para diagnóstico da doença de Chagas, desenvolvido e produzido pela empresa WAMA Diagnóstica (São Carlos-SP). O desempenho do kit foi comparado ao desempenho de um teste rápido comercial, a um teste ELISA e a um teste de IFI.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi realizar a validação de um teste de fluxo lateral para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG desenvolvido pela empresa WAMA Diagnóstica, denominado Imuno-Rápido Chagas.

Objetivos específicos

- Avaliar parâmetros de desempenho do kit como sensibilidade e especificidade clínicas, e comparar os resultados obtidos com um teste de ELISA, um teste de imunofluorescência indireta e um kit imunocromatográfico rápido para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* disponível no mercado;
- Determinar a sensibilidade analítica do kit Imuno-Rápido Chagas;
- Realizar a análise de interferentes do kit Imuno-Rápido Chagas frente a amostras reagentes para leishmaniose e toxoplasmose;
- Realizar testes de reprodutibilidade e repetibilidade do kit, além da análise do desempenho do teste ao longo do tempo, por meio da avaliação da estabilidade em tempo real e acelerada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística: O teste rápido avaliado foi produzido pela empresa WAMA Diagnóstica (São Carlos – SP).

Foram analisadas 654 amostras de soro, sendo 198 pertencentes ao Programa de Controle Externo de Sorologia – Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) e o restante amostras pertencentes à soroteca da empresa ou doadas por laboratórios. As amostras foram testadas com o teste Imuno-Rápido Chagas para pesquisa de anticorpos anti-*T.cruzi* e algumas delas com um kit comercial disponível no mercado que utiliza a mesma metodologia. Em paralelo, as amostras foram testadas pelos métodos ELISA e imunofluorescência indireta.

Aspectos Éticos: O uso das amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP) em 29 de agosto de 2016, sob Protocolo CAAE nº 58899316.5.0000.5440. As amostras de soro utilizadas foram previamente coletadas e codificadas pelo laboratório clínico de forma que a identidade dos pacientes não foi revelada à pesquisadora. Dessa forma, aprovou-se a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2 Testes com o kit Imuno-Rápido Chagas

As amostras de soro foram testadas de acordo com o procedimento descrito a seguir. Foram pipetados 10 µl de soro na cavidade da amostra da placa-teste. Em seguida, foram adicionadas quatro gotas da solução diluente e os testes foram incubados por 20 minutos em temperatura ambiente. A leitura dos resultados foi realizada pela observação das bandas formadas. O teste foi considerado positivo quando houve a formação de duas bandas, banda controle e banda teste; negativo quando houve a formação apenas da banda controle.

Figura 4 - Exemplos de resultados do teste. À esquerda, exemplo de um resultado positivo. À direita, exemplo de um resultado negativo.

Fonte: Própria autora.

3.3 Testes com kit imunocromatográfico disponível no mercado

As amostras de soro foram testadas em paralelo com um kit imunocromatográfico comercial disponível no mercado (denominado neste trabalho como *Comercial A*), seguindo as recomendações do fabricante.

Foram pipetados 100 µl de soro à cavidade de amostra da placa-teste. Em seguida, os testes foram incubados por 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura dos resultados foi realizada pela observação das bandas formadas. O teste foi considerado positivo quando houve a formação de duas bandas, banda controle e banda teste; negativo quando houve a formação apenas da banda controle.

3.4 Testes com a técnica de ELISA

As amostras de soro foram testadas também com a técnica de ELISA utilizando o kit GOLD ELISA CHAGAS (REM).

As amostras diluídas foram incubadas em poços de uma microplaca impregnados com uma combinação de antígeno recombinante e antígenos lisados purificados obtidos da forma epimastigota do parasita *Trypanosoma cruzi*. Os anticorpos específicos anti-*T. cruzi* presentes

no soro se ligam a esses antígenos. O excesso de amostra foi removido através de uma lavagem dos poços e o conjugado enzimático (anticorpos monoclonais de camundongo anti-IgG e anti-IgM humana marcados com peroxidase) foi adicionado à reação. O conjugado reagiu com os anticorpos humanos anti-*Trypanosoma cruzi* ligados aos antígenos da placa na etapa anterior. O excesso de conjugado foi retirado com novo procedimento de lavagem. Adicionou-se então o substrato cromogênico e por fim, a reação enzimática foi interrompida pela adição de um reagente bloqueador. A absorbância das reações foi medida com uma leitora padrão de microplacas de ELISA em comprimento de onda de 450 nm (GOLD ELISA CHAGAS, 2013).

3.5 Testes com a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)

As amostras de soro também foram testadas com a técnica de imunofluorescência indireta utilizando o kit IMUNO-CON CHAGAS (WAMA Diagnóstica).

As amostras de soro diluídas foram incubadas em lâminas de microscopia para fluorescência contendo parasitas fixados. Os anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* presentes no soro ligaram-se aos antígenos fixados na lâmina, e as proteínas não ligadas do soro foram removidas através de processos de lavagens. Por fim adicionou-se uma antigamaglobulina conjugada com isotiocianato de fluoresceína para revelar as amostras reagentes. Para leitura da reação, utilizou-se microscópio para fluorescência modelo CBA (marca Olympus) (IMUNO-CON CHAGAS, 2013).

3.6 Análise estatística diagnóstica

Com base nos resultados obtidos nas etapas anteriores, os dados foram analisados utilizando cálculos estatísticos diagnósticos considerando um intervalo de confiança (IC) igual a 95%. Os parâmetros calculados foram sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, coeficiente de Youden, prevalência aparente e prevalência real dos kits Imuno-Rápido Chagas e *Comercial A*. Por fim, o coeficiente *kappa* (*k*) foi calculado para avaliar o nível de concordância entre os testes imunocromatográficos rápidos.

Os conceitos foram definidos como:

- Sensibilidade: capacidade que o kit avaliado apresenta de detectar as amostras verdadeiramente positivas, ou seja, de diagnosticar corretamente as amostras contendo anticorpos IgG anti-*T. cruzi*;

- Especificidade: capacidade que o kit avaliado apresenta de detectar as amostras verdadeiramente negativas, ou seja, de diagnosticar corretamente as amostras que não apresentam anticorpos IgG anti-*T. cruzi*;

- Valor preditivo positivo (VPP): probabilidade de uma amostra avaliada e com resultado positivo ser realmente de um paciente portador de anticorpos anti-*T. cruzi*;

- Valor preditivo negativo (VPN): probabilidade de uma amostra avaliada e com resultado negativo ser realmente de um paciente sadio.

- Coeficiente de Youden: avalia o poder discriminativo de um teste diagnóstico considerando a soma de seus erros de classificação (sensibilidade e especificidade). O teste ideal apresenta valor do índice de Youden igual a um, ao passo que o teste com menor acurácia diagnóstica apresenta valor desse índice próximo a zero (YOUDEN, 1950; KLEIN, COSTA, 1987).

- Prevalência aparente: número de amostras consideradas reagentes pelo teste imunocromatográfico dividido pela amostragem real.

- Prevalência real: número de amostras contendo anticorpos anti-*T. cruzi* (segundo ELISA ou IFI) dividido pela amostragem total.

Os intervalos de confiança para a sensibilidade, especificidade, coeficiente de Youden, prevalência real e prevalência aparente foram calculados segundo método apresentado por Fleiss, Levin e Paik (2003). Por sua vez, os intervalos de confiança para os valores preditivos foram obtidos de acordo com Mercaldo, Lau e Zhou (2007).

Os parâmetros acima definidos foram calculados utilizando as fórmulas abaixo.

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros positivos}}{\text{Falsos negativos} + \text{Verdadeiros positivos}}$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros negativos}}{\text{Falsos positivos} + \text{Verdadeiros negativos}}$$

$$\text{Valor preditivo positivo (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros positivos}}{\text{Falsos positivos} + \text{Verdadeiros positivos}}$$

$$\text{Valor preditivo negativo (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros negativos}}{\text{Falsos negativos} + \text{Verdadeiros negativos}}$$

$$\text{Coeficiente de Youden (\%)} = 1 - (\text{Sensibilidade} + \text{Especificidade})$$

$$\text{Prevalência aparente (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros positivos} + \text{Falsos positivos}}{\text{Total de amostras testadas}}$$

$$\text{Prevalência real (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros positivos} + \text{Falsos negativos}}{\text{Total de amostras testadas}}$$

O coeficiente *kappa* foi calculado segundo método descrito por Cohen (1960) e considerou-se um intervalo de confiança de 95%.

3.7 Controle de qualidade do kit Imuno-Rápido Chagas

3.7.1 Análise da sensibilidade analítica do kit Imuno-Rápido Chagas

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 206 de 2006, a sensibilidade analítica de um teste é definida como a menor quantidade ou grau que se pode detectar em uma reação. No caso do teste imunocromatográfico rápido avaliado neste estudo, a sensibilidade analítica do kit é a menor concentração de anticorpos anti-*T. cruzi* que pode ser detectada pelo teste (BRASIL, 2006).

Como a linhagem *T. cruzi* II é endêmica no Brasil, optou-se por adquirir um padrão internacional quantificado para anticorpos anti-*T. cruzi* II em plasma humano (NIBSC code 09/186). Para análise da sensibilidade analítica, foram realizadas diluições seriadas desse material (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 UI/mL) em plasma não reagente e as mesmas foram testadas em oito réplicas. Em seguida, calculou-se a sensibilidade analítica do kit utilizando a análise *Probit* e um intervalo de confiança de 95%.

3.7.2 Teste de reprodutibilidade

Para avaliar se o kit é capaz de reproduzir os mesmos resultados quando testado sob diferentes condições (operador, lote e dias diferentes) utilizando-se as mesmas amostras, realiza-se o teste de reprodutibilidade (ANDRADE; ZICKER, 1997; CAMARGO, 2015).

Selecionamos dez amostras de soro reagentes e dez amostras de soro não reagentes para Chagas e as testamos utilizando três lotes diferentes do kit. Os lotes foram testados em dias diferentes.

3.7.3 Teste de repetibilidade

O objetivo do teste de repetibilidade é avaliar se o kit desenvolvido repete seus resultados quando testado repetidamente sob as mesmas condições (mesmo dia, mesmo operador, e mesmas amostras) (CAMARGO, 2015).

Selecionamos dez amostras de soro reagentes e dez amostras de soro não reagentes para Chagas e as testamos com o mesmo lote do kit, mesmo operador e mesmo dia, sendo realizadas três repetições de cada teste.

3.7.4 Análise de estabilidade em tempo real e acelerada

3.7.4.1 Estabilidade acelerada

Para realizar o teste de estabilidade acelerada, o kit é submetido a altas temperaturas para acelerar sua degradação até que o desempenho do mesmo atinja limites inaceitáveis. A degradação do produto submetido ao estresse de temperatura é comparada à degradação do produto armazenado em condições ideais, sendo possível estabelecer uma correlação entre ambas que indicará o prazo de validade do kit. Espera-se uma queda na reatividade das amostras com a perda da estabilidade do teste (MENEGHISSE, 2007; CAMARGO, 2015).

Como são raros estudos de estabilidade específicos para kits diagnósticos e não existem normativas bem estabelecidas, os testes de estabilidade acelerada são realizados com base no conhecimento do produto e na experiência de outros fabricantes do setor (MENEGHISSE, 2007; CAMARGO, 2015).

Para avaliar a estabilidade acelerada do kit Imuno-Rápido Chagas, foram colocados 15 testes em uma estufa a 56°C por um período de três dias, e o tampão diluente permaneceu nessa temperatura por sete dias. Foram retirados diariamente cinco testes da estufa, e após os

sete dias de incubação do tampão, os testes foram realizados. Os resultados foram comparados com um kit armazenado em condições ideais.

3.7.4.2 Estabilidade em tempo real

Um kit armazenado em condições ideais foi testado de acordo com as instruções de uso utilizando-se três amostras de soro reagentes e três amostras de soro não reagentes. Os testes foram realizados bimestralmente desde a data de fabricação do produto, sendo avaliados dois parâmetros: a funcionalidade do teste e a perda da estabilidade do mesmo.

3.8 Análise de reação cruzada

A fim de avaliar se algumas patologias interferem nos resultados do kit Imuno-Rápido Chagas, foram testadas 27 amostras sabidamente negativas para doença de Chagas, sendo vinte sabidamente positivas para leishmaniose tegumentar americana e sete sabidamente positivas para anticorpos anti-toxoplasmose da classe IgG.

As amostras também foram testadas utilizando a técnica de imunofluorescência indireta para analisar se essas patologias interferem igualmente entre as duas técnicas.

Para essa análise, selecionaram-se amostras reagentes para leishmaniose pois a reação cruzada entre essa patologia e os testes sorológicos para detecção a doença de Chagas é bem estabelecida (PEREIRA et al, 2012).

Nessa análise também foram incluídas amostras reagentes para toxoplasmose visto que grande parte da população mundial já teve contato com o parasita *Toxoplasma gondii* e por serem requisitados exames sorológicos para toxoplasmose durante o pré-natal de gestantes. (GALVÁN-RAMÍREZ et al, 1998; BRANCO, ARAÚJO, FALAVIGNA-GUILHERME, 2012).

4. RESULTADOS

4.1 Validação do teste

4.1.1. Testes realizados com a técnica de ELISA

As amostras foram testadas utilizando a técnica de ELISA, conforme descrito no item 3.4 da seção Material e Métodos. Os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 1 e apêndice A.

Tabela 1 - Resultados obtidos para as amostras testadas utilizando a técnica de ELISA.

ELISA	
Reagente	259 amostras
Não Reagente	395 amostras
Total	654 amostras

Segundo a técnica de ELISA, das 654 amostras testadas, 259 amostras são reagentes para anticorpos anti-*T. cruzi* e 395 são amostras não reagentes.

4.1.2 Testes realizados com a técnica de imunofluorescência indireta

As amostras foram testadas utilizando a técnica de IFI, conforme descrito no item 3.5 da seção Material e Métodos. Os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 2 e apêndice A.

Tabela 2 - Resultados obtidos para as amostras testadas utilizando a técnica de imunofluorescência indireta.

Imunofluorescência indireta	
Reagente	259 amostras
Não Reagente	395 amostras
Total	654 amostras

Segundo a técnica de IFI, das 654 amostras testadas, 259 amostras são reagentes para anticorpos anti-*T. cruzi* e 395 são amostras não reagentes.

Após os testes realizados com as metodologias de ELISA e IFI, concluiu-se que as mesmas apresentaram resultados concordantes para todas as amostras. Com base nessas informações, calculou-se a prevalência real da doença de Chagas na amostragem utilizada como descrito no item 3.6 da seção Material e Métodos. O valor encontrado para este parâmetro foi de 39,6% (35,9% - 43,5%; IC 95%).

Sabe-se que ainda hoje não existe um teste diagnóstico referência para a pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde e o Ministério da Saúde, a confirmação laboratorial de um caso de doença de Chagas na fase crônica ocorre quando há positividade em dois testes sorológicos de princípios distintos ou com diferentes preparações antigênicas (WHO, 2002; BRASIL MS, 2016).

As técnicas de ELISA e IFI apresentam princípios distintos e são amplamente utilizadas em hemocentros, hospitais e laboratórios de análises clínicas para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*. Como o kit de ELISA utilizado nesse trabalho é composto por uma mistura de antígenos recombinantes e antígenos totais (preparação antigênica distinta do teste de IFI), os resultados obtidos nessas técnicas foram utilizados para caracterizar as amostras testadas como verdadeiramente positivas, verdadeiramente negativas, falso positivas e falso negativas.

4.1.3 Análise estatística diagnóstica– Imuno-rápido Chagas

O teste teve por finalidade verificar o desempenho do kit Imuno-Rápido Chagas, o qual foi comparado com as técnicas de ELISA e de IFI. Os testes foram realizados de acordo com as instruções de uso, conforme descrito no item 3.2 em Material e Métodos.

Foram analisadas 654 amostras de soro, sendo 198 pertencentes ao Programa de Controle Externo de Sorologia (PNCQ) e o restante das amostras pertencentes à soroteca da empresa ou doadas por laboratórios. A listagem das amostras e seus resultados estão disponíveis no Apêndice A.

Os parâmetros foram calculados conforme descrito no item 3.6 em Material e Métodos. Os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo podem ser observados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do kit Imuno-Rápido Chagas para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* utilizando-se as técnicas de ELISA e IFI como testes referência.

Imuno-Rápido Chagas	ELISA/IFI		Total
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	255	1	256
Não Reagente	4	394	398
Total	259	395	654

De acordo com os testes realizados e considerando um intervalo de confiança de 95%, determinou-se que a sensibilidade do kit Imuno-Rápido Chagas é de 98,5%, a especificidade é de 99,7% e o coeficiente de Youden calculado foi de 98,2%. O kit apresentou valor preditivo positivo de 99,6%, valor preditivo negativo de 99,0% e prevalência aparente de 39,1%.

Tabela 4 - Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, coeficiente de Youden e prevalência aparente obtidos para o kit Imuno-Rápido Chagas considerando um IC de 95%.

Medida de desempenho	Imuno-Rápido Chagas	IC 95%
Sensibilidade	98,5%	(95,8% - 99,5%)
Especificidade	99,7%	(98,4% - 100%)
Valor Preditivo Positivo	99,6%	(98,8% - 100%)
Valor Preditivo Negativo	99,0%	(98,0% - 100%)
Coeficiente de Youden	98,2%	(96,6% - 99,8%)
Prevalência aparente	39,1%	(35,4% - 43,0%)

4.1.4 Análise estatística diagnóstica – Comercial A

O teste teve por finalidade verificar o desempenho do kit *Comercial A*, o qual foi comparado com as técnicas de ELISA de IFI. Os testes foram realizados de acordo com as instruções de uso, conforme descrito no item 3.3 em Material e Métodos.

Como o teste *Comercial A* requer 100 µl de amostra e amostras reagentes para doença de Chagas são raras no estado de São Paulo, não foi possível testar todas as 654 amostras que foram testadas com IFI, ELISA e no kit Imuno-Rápido Chagas. Sendo assim, foram analisadas 395 amostras, sendo 198 pertencentes ao Programa de Controle Externo de Sorologia (PNCQ) e o restante das amostras de soro pertencentes à soroteca da empresa ou doadas por laboratórios. A listagem das amostras e seus resultados estão disponíveis no Apêndice A.

Os parâmetros foram calculados conforme descrito no item 3.6 em Material e Métodos. Os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo podem ser observados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do kit Comercial A para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* utilizando-se as técnicas de ELISA e IFI como testes referência.

<i>Comercial A</i>	ELISA/IFI		Total
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	154	1	155
Não Reagente	2	238	240
Total	156	239	395

Tabela 6 - Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, coeficiente de Youden e prevalência aparente para o kit Comercial A, considerando um IC de 95%.

Medida de desempenho	<i>Comercial A</i>	IC 95%
Sensibilidade	98,7%	(95,0% - 99,8%)
Especificidade	99,6%	(97,3% - 100%)
Valor Preditivo Positivo	99,4%	(98,1% - 100%)
Valor Preditivo Negativo	99,2%	(98,0% - 100%)
Coeficiente de Youden	98,3%	(96,4% - 100%)
Prevalência aparente	39,2%	(34,4% - 44,3%)

De acordo com os testes realizados e considerando um intervalo de confiança de 95%, determinou-se que a sensibilidade do kit *Comercial A* é de 98,7%, a especificidade é de 99,6% e o coeficiente de Youden calculado foi de 98,3%. O kit apresentou valor preditivo positivo de 99,4%, valor preditivo negativo de 99,2% e prevalência aparente de 39,2%. Como a amostragem utilizada nesse teste foi menor, a prevalência real foi recalculada, apresentando um valor de 39,5%.

4.1.5 Cálculo coeficiente *kappa* entre os kits Imuno-Rápido Chagas e Comercial A

O coeficiente *kappa* foi calculado como descrito no item 3.6 da seção Material e métodos.

Este índice é uma medida de concordância que reflete o quanto as observações se afastam do esperado. Seu valor varia de “menos 1” (completo desacordo) a “mais 1” (concordância total). A tabela 7 apresenta os valores de *k* e suas respectivas interpretações (LANDIS; KOCH, 1977; ANDRADE; ZICKER, 1997).

O valor de *k* encontrado para os kits Imuno-Rápido Chagas e Comercial A foi 0,9947 (0,9842 – 1,00), indicando concordância perfeita entre os testes diagnósticos.

Tabela 7 - Valores de índice kappa e suas interpretações.

Valor de <i>kappa</i>	Nível de concordância
<0,00	Não existe concordância
0,00 – 0,20	Concordância mínima
0,21 – 0,40	Concordância razoável
0,41 – 0,60	Concordância moderada
0,61 – 0,80	Concordância substancial
0,81 – 1,00	Concordância perfeita

Fonte: Adaptado de LANDIS; KOCH (1977).

4.2 Controle de Qualidade do teste

4.2.1 Teste de Sensibilidade Analítica

O teste de sensibilidade analítica foi realizado como descrito no item 3.7.1 da seção Material e Métodos, e a menor concentração de anticorpo detectada pelo teste foi determinada a partir da análise *Probit* considerando um intervalo de confiança de 95%. Os resultados podem ser visualizados na tabela 8.

A sensibilidade analítica do kit Imuno-Rápido Chagas é de 0,235 UI de anticorpos anti-*T. cruzi* II/mL.

Tabela 8 - Resultados do teste de sensibilidade analítica do kit Imuno-Rápido Chagas. Foram realizadas diluições seriadas do padrão internacional quantificado para anticorpos anti-*T. cruzi* II em plasma humano (NIBSC code 09/186) e as mesmas foram testadas em oito réplicas.

Concentração anticorpos anti-<i>T. cruzi</i> II (Diluições NIBSC code 09/186)	Total de réplicas	Resultados positivos observados/total de réplicas
1,0 UI/mL	8	8/8
0,5 UI/mL	8	8/8
0,25 UI/mL	8	8/8
0,125 UI/mL	8	8/8
0,0625 UI/mL	8	2/8
0,03125 UI/mL	8	0/8
0,015625 UI/mL	8	0/8

4.2.2 Teste de reprodutibilidade

O teste de reprodutibilidade do kit foi realizado conforme descrito no item 3.7.2 em Material e Métodos. Os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 9.

Independente do lote do kit e do dia em que o teste foi realizado, as amostras reagentes testadas foram corretamente detectadas e as amostras não-reagentes também apresentaram os resultados esperados. Notou-se que não houve variação na intensidade da amostra classificada como fracamente reagente, indicando que provavelmente os diferentes lotes do kit apresentam a mesma sensibilidade.

Como foram obtidos os mesmos resultados para os lotes testados, concluiu-se que o kit Imuno-Rápido Chagas é capaz de reproduzir de maneira satisfatória os resultados mesmo quando as amostras são testadas sob diferentes condições (lotes diferentes do produto e testes realizados em dias diferentes).

Tabela 9 - Resultados da análise de reprodutibilidade do kit Imuno-Rápido Chagas. Foram testadas dez amostras de soro reagentes para anticorpos anti-*T. cruzi* e dez amostras não reagentes utilizando três lotes diferentes do kit. Os testes foram realizados em dias diferentes.

Amostra	ELISA/IFI	Lote 1	Lote 2	Lote 3
1R	Reagente (Reag)	Reag	Reag	Reag
2R	Reagente	Reag	Reag	Reag
3R	Reagente	Reag	Reag	Reag
4R	Reagente	Reag	Reag	Reag
5R	Reagente	Fracamente Reag	Fracamente Reag	Fracamente Reag
6R	Reagente	Reag	Reag	Reag
7R	Reagente	Reag	Reag	Reag
8R	Reagente	Reag	Reag	Reag
9R	Reagente	Reag	Reag	Reag
10R	Reagente	Reag	Reag	Reag
1NR	Não reagente (NR)	NR	NR	NR
2NR	Não reagente	NR	NR	NR
3NR	Não reagente	NR	NR	NR
4NR	Não reagente	NR	NR	NR
5NR	Não reagente	NR	NR	NR
6NR	Não reagente	NR	NR	NR
7NR	Não reagente	NR	NR	NR
8NR	Não reagente	NR	NR	NR
9NR	Não reagente	NR	NR	NR
10NR	Não reagente	NR	NR	NR

4.2.3 Teste de repetibilidade

O teste de repetibilidade do kit foi realizado conforme descrito no item 3.7.3 da seção Material e Métodos. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 10.

Mantendo-se as mesmas condições dos testes, foi possível observar que o kit reproduziu os resultados em todas as repetições. As amostras reagentes foram corretamente identificadas e as amostras não reagentes apresentaram os resultados esperados em todos os testes. A amostra “5R”, classificada como fracamente reagente, apresentou a mesma intensidade de banda teste em todas as repetições, indicando boa repetibilidade do kit.

Assim, concluiu-se que o kit Imuno-Rápido Chagas é capaz de repetir de maneira satisfatória os resultados quando as amostras são testadas sob as mesmas condições.

Tabela 10 - Resultados da análise de repetibilidade do kit Imuno-Rápido Chagas. Foram testadas cinco amostras de soro reagentes para anticorpos anti-*T. cruzi* e cinco amostras não reagentes em quintuplicata sob as mesmas condições (mesmo lote, operador e dia de teste).

Amostra	ELISA/IFI	Repetições				
		1	2	3	4	5
1R	Reag	Reag	Reag	Reag	Reag	Reag
2R	Reag	Reag	Reag	Reag	Reag	Reag
3R	Reag	Reag	Reag	Reag	Reag	Reag
4R	Reag	Reag	Reag	Reag	Reag	Reag
5R	Reag	Fraca Reag	Fraca Reag	Fraca Reag	Fraca Reag	Fraca Reag
1NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
5NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

4.2.4 Teste de estabilidade acelerada

Para a realização do teste de estabilidade acelerada, partiu-se da experiência prévia da empresa WAMA Diagnóstica com produtos da mesma linha. Estabeleceu-se que o tampão diluente em estufa a 56°C por 7 dias e a placa teste em estufa a 56°C por 3 dias correspondem a 18 meses de validade da maioria dos testes rápidos.

Os testes foram realizados conforme descrito no item 3.7.4.1 da seção Material e Métodos. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 11 e figura 5.

Tabela 11 - Resultados do teste de estabilidade acelerada. Foram testados kits mantidos a 56°C por um, dois e três dias, e um kit armazenado em temperatura ideal (2 a 30°C).

Amostra	ELISA/IFI	Kit 2 a 30°C	Kit após 1 dia a 56°C	Kit após 2 dias a 56°C	Kit após 3 dias a 56°C
1R	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
2R	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
5R	Fracamente reagente	Fracamente reagente	Fracamente reagente	Fracamente reagente	Fracamente reagente
1NR	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
2NR	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente

A análise comparativa dos testes mostrou que as bandas teste dos cassetes submetidos ao estresse de temperatura ficaram gradativamente mais claras que as bandas dos cassetes armazenados em condições ideais. Tal fato era esperado considerando que os antígenos utilizados na fabricação dos testes sofreram degradação parcial quando submetidos à alta temperatura.

Apesar das intensidades mais claras das bandas teste, não foi observado nenhum falso resultado. As amostras reagentes, inclusive a amostra fracamente reagente, foram detectadas pelo teste mesmo após o kit ter sido mantido por 3 dias a 56°C.

De acordo com os testes realizados, foi verificado que mesmo após o estresse de temperatura, o kit Imuno-Rápido Chagas manteve sua estabilidade e seu bom funcionamento. Esse dado deve ser relacionado com o teste de estabilidade em tempo real para que seja possível determinar com precisão o prazo de validade do kit.

Figura 5 - Resultado do teste de estabilidade acelerada. Na linha superior encontram-se os testes armazenados em temperatura ideal (2 a 30°C) e na linha inferior os testes submetidos a estresse de temperatura por 3 dias. A identificação das amostras encontra-se acima da figura.

Fonte: Própria autora.

4.2.5 Teste de estabilidade em tempo real

Os testes foram realizados conforme descrito no item 3.7.4.2 da seção Material e Métodos. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 12.

Após oito meses de fabricação, nota-se que o teste apresenta o mesmo desempenho de quando foi fabricado, sendo capaz de identificar corretamente as amostras reagentes e não reagentes. É possível observar que o teste manteve sua sensibilidade e estabilidade durante esse período, uma vez que a amostra “5R”, considerada fracamente positiva, foi detectada corretamente.

Não foi possível realizar o teste de estabilidade em tempo real por 18 meses (prazo de validade comum para testes imunocromatográficos rápidos) pois houve uma alteração na fórmula do kit Imuno-Rápido Chagas em agosto de 2017, impossibilitando completar esse estudo antes da entrega da dissertação. Todavia, foram realizados testes de estabilidade em tempo real com a formulação anterior durante 18 meses, e o kit manteve seu desempenho. Como a maioria dos reagentes não foi alterada, acredita-se que os testes manterão sua estabilidade com base nos resultados obtidos anteriormente.

Tabela 12 - Resultados do teste de estabilidade em tempo real do kit Imuno-Rápido Chagas. Os testes foram realizados bimestralmente desde a data de fabricação do kit (agosto/2017) até abril/2018. Foram selecionadas três amostras de soro reagentes para anticorpos anti-*T. cruzi* e três amostras não reagentes para esse estudo.

Amostra	ELISA/IFI	Agosto/2017 (Fabricação)	Outubro 2017	Dezembro 2017	Fevereiro 2018	Abril 2018
1R	Reagente (Reag)	Reag	Reag	Reag	Reag	Reag
2R	Reagente	Reag	Reag	Reag	Reag	Reag
5R	Reagente	Fraca Reag	Fraca Reag	Fraca Reag	Fraca Reag	Fraca Reag
1NR	Não Reagente (NR)	NR	NR	NR	NR	NR
2NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

4.2.6 Análise de reação cruzada

A análise de reação cruzada do kit Imuno-Rápido Chagas foi realizada conforme descrito no item 3.7.5 da seção Material e Métodos. Todos os resultados estão disponíveis no Apêndice B e um resumo destes pode ser observado na tabela 13.

Tabela 13 - Resultados da análise de reação cruzada do kit Imuno-Rápido Chagas. Foram testadas 20 amostras de soro reagentes para leishmaniose e sete amostras reagentes para toxoplasmose. Todas as amostras eram não reagentes para anticorpos anti-*T. cruzi*. Os resultados foram comparados aos obtidos utilizando a técnica de imunofluorescência indireta.

Patologia	Total de amostras	Resultado Falso Positivo	
		Imuno-Rápido Chagas	IFI
Leishmaniose tegumentar americana	20	1	14
Toxoplasmose IgG	7	0	0

Para as amostras reagentes para leishmaniose tegumentar americana, o kit Imuno-Rápido Chagas apresentou um resultado falso positivo, entre 20 amostras testadas. O kit de IFI, por sua vez, apresentou 14 resultados falso positivos.

Sabe-se que existe reatividade cruzada entre amostras reagentes para leishmaniose e testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* que utilizam diferentes metodologias. Portanto, os resultados obtidos nesse experimento condizem com o descrito na literatura.

Nota-se que o kit imunocromatográfico rápido foi mais específico e apresentou menos resultados falso positivos que a metodologia de imunofluorescência indireta. Provavelmente, essa diferença se deve ao uso de antígenos recombinantes no teste de fluxo lateral.

Não havia volume suficiente de amostra para testar o kit *Comercial A* e avaliar se o antígeno recombinante utilizado na fabricação deste é mais específico.

As amostras reagentes para anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii* não foram detectadas por nenhuma das duas metodologias, isto é, os kits não apresentaram reação cruzada com essa patologia.

5. DISCUSSÃO

5.1 Análise estatística diagnóstica

A fase crônica da doença de Chagas é caracterizada por baixa parasitemia e pela presença de anticorpos anti-*T. cruzi*. Sendo assim, o diagnóstico dessa fase é realizado por métodos sorológicos, tais como ELISA, IFI e HAI, os quais em sua maioria contêm antígenos totais do parasita. A fim de solucionar os problemas de resultados falso negativos e falso positivos dos testes sorológicos tradicionais, testes sorológicos não convencionais foram desenvolvidos utilizando proteínas recombinantes de *T. cruzi*. Dentre essa nova geração de testes diagnósticos, encontram-se os testes imunocromatográficos rápidos, que são sensíveis, específicos, fornecem resultados em um curto período de tempo e são de fácil execução, dispensando a necessidade de profissionais especializados e de equipamentos sofisticados, além de permitir o diagnóstico de populações situadas em locais de difícil acesso (VERANI et al., 2009; REITHINGER et al., 2010; DUARTE et al., 2014; SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2014).

Neste trabalho descreveu-se a validação de um teste imunocromatográfico rápido para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, denominado Imuno-Rápido Chagas. O desempenho deste kit foi comparado ao de um teste comercial de mesma metodologia, denominado nessa dissertação de *Comercial A*, e com as técnicas de imunofluorescência indireta e ELISA.

Para análise de sensibilidade e especificidade clínica do kit Imuno-Rápido Chagas, foram testadas 654 amostras de soro. De acordo com os testes realizados, a sensibilidade e especificidade clínicas do kit Imuno-Rápido Chagas são 98,5% e 99,7%, respectivamente. A prevalência aparente do kit foi de 39,1%, comparada a prevalência real que foi de 39,6%. O valor preditivo positivo encontrado foi de 99,6%, indicando que a cada 100 testes positivos, 99,6 seriam de pacientes chagásicos. Por outro lado, o valor preditivo negativo foi de 99,0%, isto é, a cada 100 testes negativos, 99 seriam de pacientes saudáveis. Devido a alta prevalência da doença de Chagas na amostragem testada (aproximadamente 40%), os valores preditivos encontrados também foram altos (próximos a 100%). O coeficiente de Youden obtido para esse kit foi de 98,2% (0,982), indicando que o desempenho geral do teste foi bom.

O kit Imuno-Rápido Chagas não foi capaz de identificar quatro amostras caracterizadas como reagentes, apresentando sensibilidade clínica e prevalência inferiores aos apresentados pelos testes convencionais. Devido aos quatro resultados falso negativos, o VPN

encontrado para o kit foi inferior a 100%. Como o teste imunocromatográfico rápido é composto principalmente por antígenos recombinantes que o tornam mais específico, sua sensibilidade tende a ser ligeiramente inferior aos testes que utilizam antígenos totais. Além disso, o método imunocromatográfico de fluxo lateral é mais simples que as técnicas de imunofluorescência e imunoenzimática, pois apresenta o resultado da reação em poucos minutos e em uma única etapa, dispensando a realização de várias incubações e sucessivas lavagens. Essas características inerentes aos testes imunocromatográficos rápidos também influenciam em sua sensibilidade e especificidade (WHO, 2002; DUARTE et al, 2014).

Com relação às amostras não reagentes, o kit Imuno-Rápido Chagas detectou um resultado falso positivo, resultando em um VPP inferior a 100%. Como foram testadas várias amostras não reagentes ($n = 395$) e apenas uma amostra foi detectada incorretamente, acredita-se que o problema seja pontual. Provavelmente, a amostra em questão continha algum interferente, como lipemia ou hemólise, ou algum anticorpo que apresentou reação cruzada com o teste.

Existem na literatura artigos que avaliam o desempenho de testes rápidos comerciais para detecção da doença de Chagas. SÁNCHEZ-CAMARGO e colaboradores (2014) realizaram um estudo multicêntrico em áreas endêmicas e não endêmicas para a doença de Chagas, avaliando o desempenho de nove testes imunocromatográficos rápidos para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*. Foram utilizadas apenas amostras de soro, e os valores de sensibilidade dos kits variaram entre 10,6 e 97,2%, e os valores de especificidade entre 70,7 e 97%. Outros estudos avaliando o desempenho desses testes em rotinas de banco de sangue e em centros de saúde primária foram reportados, sendo a maioria realizado em regiões endêmicas da doença de Chagas, como Bolívia, Peru e alguns no Brasil. Em geral, quando utilizadas amostras de soro, a sensibilidade clínica encontrada para diferentes testes imunocromatográficos rápidos é de 88 a 99,3%, e a especificidade de 96,9 a 100%. Ao comparar os dados da literatura com os valores de sensibilidade e especificidade calculados para o kit Imuno-Rápido Chagas, nota-se que o desempenho deste teste é semelhante ou superior aos de outros testes disponíveis no mercado. (VERANI et al., 2009; CHAPPUIS et al., 2010; FLORES-CHÁVEZ et al., 2010; REITHINGER et al., 2010; BARFIELD et al., 2011; FLORES-CHÁVEZ et al., 2012; DUARTE et al., 2014; MENDICINO et al., 2014; SHAH et al., 2014).

Para realizar uma avaliação mais completa da habilidade do kit Imuno-Rápido Chagas em discriminar amostras reagentes e não reagentes para doença de Chagas, testou-se um kit comercial de mesma metodologia (*Comercial A*). Devido à falta de volume de algumas

amostras, a amostragem testada foi menor ($n = 395$). Os parâmetros estatísticos de desempenho do kit *Comercial A* considerando um intervalo de confiança de 95% foram: sensibilidade igual a 98,7%, especificidade igual a 99,6%, e o coeficiente de Youden calculado foi de 98,3%. O kit apresentou valor preditivo positivo de 99,4%, valor preditivo negativo de 99,2% e prevalência aparente de 39,2%. Considerando essa amostragem, os parâmetros para o kit Imuno-Rápido Chagas foram recalculados: a sensibilidade encontrada foi de 98,1%, a especificidade de 99,6%, e o coeficiente de Youden igual a 97,7%. Os valores preditivos positivo e negativo encontrados foram de 99,4% e 98,8%, respectivamente. Como a amostragem utilizada para esses testes foi menor, a prevalência real foi recalculada, apresentando um valor de 39,5%.

Ao comparar os resultados encontrados para os kits, notamos que ambos apresentaram resultados falso negativos: o kit *Comercial A* não detectou duas amostras reagentes, e o kit Imuno-Rápido Chagas não detectou três. As técnicas de IFI e ELISA são mais sensíveis que a imunocromatografia de fluxo lateral por utilizarem diversos períodos de incubação e preparações antigênicas obtidas de lisados do parasita. Os testes imunocromatográficos, por outro lado, são realizados em uma única etapa e permitem a leitura dos resultados em poucos minutos. Além disso, utilizam antígenos recombinantes em sua formulação, os quais podem apresentar epítomos que não são reconhecidos por alguns anticorpos presentes nas amostras.

Como o kit *Comercial A* detectou uma amostra reagente a mais que o kit Imuno-Rápido Chagas, a sensibilidade clínica encontrada para esse foi ligeiramente superior (diferença de 0,6%). Consequentemente, os valores de prevalência aparente e VPN calculados para o kit *Comercial A* também foram mais altos. Um dos motivos dessa diferença se deve ao volume de amostra e de tampão diluente utilizado pelos testes: o kit Imuno-Rápido Chagas requer 20 vezes menos amostra que o kit *Comercial A*, além de serem adicionados 120 μ l de tampão diluente ao teste, o que dilui ainda mais a concentração de anticorpos da amostra. Outro componente do teste que pode contribuir para a diferença de sensibilidade encontrada é o antígeno recombinante utilizado. É possível que o antígeno utilizado pelo kit *Comercial A* apresente epítomos distintos do antígeno utilizado no kit Imuno-Rápido Chagas, o que implica na identificação de diferentes anticorpos. Além desses fatores, o conjugado utilizado também influencia na sensibilidade do kit. A bula do kit *Comercial A* afirma que o mesmo utiliza um conjugado de antígeno para detecção de anticorpos, isto é, o ouro coloidal é conjugado a um antígeno. Com essa conformação, o kit é capaz de detectar qualquer classe de imunoglobulina

anti-*T. cruzi* presente na amostra. Já o kit Imuno-Rápido Chagas utiliza um conjugado de proteína G, o qual se liga apenas a anticorpos da classe IgG presentes na amostra.

Cada kit apresentou um resultado falso positivo e, portanto, os valores de especificidade clínica e VPP calculados para os testes foram iguais. Como a amostra detectada incorretamente pelo kit comercial foi diferente da detectada pelo Imuno-Rápido Chagas, acredita-se que sejam problemas pontuais. Esses falsos resultados podem ser explicados por interferentes inerentes à amostra, como lipemia ou hemólise, ou por algum anticorpo presente na amostra que sofreu reação cruzada com o antígeno impregnado na banda teste.

Ao analisar os coeficientes de Youden obtidos para os testes, nota-se que o kit *Comercial A* apresentou um valor ligeiramente superior ao Imuno-Rápido Chagas (diferença de 0,5%). Esse coeficiente indica o desempenho geral do kit baseado no quanto ele se afastou do esperado, por isso considera resultados falso positivos e falso negativos. Como o kit *Comercial A* apresentou menos resultado falso negativo, o coeficiente de Youden do mesmo foi discretamente maior que o obtido para o Imuno-Rápido Chagas.

Para avaliar a concordância entre os kits imunocromatográficos rápidos, calculou-se o índice *kappa*, o qual foi estimado em 0,9947. De acordo com a classificação realizada por Landis e Koch (1977), os kits apresentaram correlação perfeita entre seus resultados.

5.2 Controle de qualidade do kit Imuno-Rápido Chagas

Um dos parâmetros calculados para avaliar o desempenho do kit Imuno-Rápido Chagas foi a sensibilidade analítica. A partir de diluições de um padrão internacional e utilizando a análise estatística de *Probit*, concluiu-se que a menor concentração de anticorpos anti-*T. cruzi* II identificada pelo teste imunocromatográfico é 0,235 UI/mL. OTANI e colaboradores (2011) realizaram uma avaliação desse padrão como controle de qualidade de kits diagnósticos, entre os quais estavam três testes rápidos. Estes testes foram capazes de detectar as diluições entre 1:6 e 1:15, ou seja, aproximadamente 0,17 e 0,067 UI/mL. Como cada teste foi realizado apenas em duplicata e não foram realizadas análises estatísticas com relação a detecção dessas diluições, não é possível comparar o resultado obtido pela análise *Probit* para o kit Imuno-Rápido Chagas. Todavia, considerando apenas as diluições detectadas, nota-se que o teste avaliado nessa dissertação identificou corretamente até a diluição 1:8 (aproximadamente 0,125 UI/mL). Comparando com os resultados obtidos por

OTANI e colaboradores (2011), conclui-se que o kit Imuno-Rápido Chagas apresenta um limite de detecção próximo aos de outros testes comerciais.

O teste imunocromatográfico avaliado apresentou reação cruzada com uma amostra reagente para leishmaniose. A reação cruzada entre leishmaniose e testes sorológicos para detecção da doença de Chagas é bem estabelecida. Como os parasitas causadores dessas doenças pertencem à mesma família (Trypanosomatidae), acredita-se que *Leishmania* spp. pode apresentar similaridades genéticas com os antígenos *T. cruzi* e os pacientes acometidos por esses parasitas podem apresentar anticorpos que reconheçam epítomos dos antígenos utilizados nos testes sorológicos para doença de Chagas (DUARTE et al, 2014).

Quando comparado à técnica de IFI, o teste rápido mostrou-se mais específico. Essa diferença se deve ao tipo de antígeno utilizado: nos testes de IFI são impregnadas epimastigotas de *T. cruzi* nas lâminas (antígenos total), o que torna a técnica altamente sensível, porém pouco específica. Por sua vez, o teste imunocromatográfico rápido utiliza antígenos recombinantes, o que reduz as ligações inespecíficas e aumenta a especificidade do teste (PEREIRA et al, 2012).

FLORES-CHÁVEZ e colaboradores (2010) compararam o uso de técnicas sorológicas convencionais e não convencionais para diagnóstico da doença de Chagas na Espanha. Dentre os kits testados, encontravam-se um kit de IFI e dois kits imunocromatográficos rápidos. Os autores realizaram uma análise de interferentes com 30 amostras reagentes para leishmaniose: o kit de IFI apresentou 23 resultados falso positivos, um teste rápido apresentou cinco e o outro teste rápido apresentou apenas um. Logo, os resultados obtidos na análise de interferentes do kit Imuno-rápido Chagas se assemelham aos observados na literatura para outros testes imunocromatográficos rápidos.

Por serem de fácil execução, apresentarem os resultados em poucos minutos, não necessitarem de infraestrutura laboratorial nem de recursos humanos especializados, os testes não convencionais são os mais indicados para a triagem de populações para a doença de Chagas em locais de difícil acesso ao sistema de saúde. A validação desses métodos diagnósticos se faz extremamente necessária para que no mesmo atendimento seja possível o paciente realizar o teste, ter conhecimento do resultado e, se necessário, ser direcionado ao tratamento. Esses testes diagnósticos também são úteis para monitoramento de surtos e levantamentos epidemiológicos.

Atualmente, existe apenas um teste de fluxo lateral para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG registrado na ANVISA e disponível no mercado nacional, o qual é

importado. Como o teste da WAMA Diagnóstica (Imuno-Rápido Chagas) é uma produção totalmente nacional, a validação desse teste se faz importante para reduzir a dependência de testes estrangeiros, impulsionando avanços tecnológicos no setor e permitindo às empresas brasileiras competirem no mercado com as multinacionais.

6. CONCLUSÕES

- O kit Imuno-Rápido Chagas é capaz de detectar anticorpos da classe IgG anti-*T. cruzi*, apresentando boa sensibilidade e boa especificidade. O desempenho do kit é comparável ao de outros testes comerciais que utilizam a mesma metodologia, podendo assim ser utilizado para auxiliar no diagnóstico da fase crônica da doença de Chagas.
- A sensibilidade analítica encontrada para o kit Imuno-Rápido Chagas é similar à de outros testes rápidos comerciais.
- O kit avaliado mantém seu bom funcionamento após oito meses de sua fabricação; além disso, o funcionamento do mesmo não é alterado após sofrer estresse de temperatura.
- O kit Imuno-Rápido Chagas reproduz os resultados quando testado sob diferentes condições e repete os resultados quando testado sob as mesmas condições.
- O kit avaliado é mais específico que a técnica de IFI frente a amostras reagentes para leishmaniose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A. L. S. S.; ZICKER, F., org. **Métodos de investigação epidemiológicas em doenças transmissíveis**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, v. 1, 1997.
- BALOUZ, V.; AGÜERO, F.; BUSCAGLIA, C.A. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. **Adv Parasitol**, v. 97, p. 1-145, 2017. doi: 10.1016/bs.apar.2016.10.001.
- BARFIELD, C.A. et al. A Highly Sensitive Rapid Diagnostic Test for Chagas Disease That Utilizes a Recombinant *Trypanosoma cruzi* Antigen. **IEEE Trans Biomed Eng.**, v. 58, n. 3, p. 814-817, 2011. doi:10.1109/TBME.2010.2087334.
- BERN, C. Chagas'Disease. **N Engl J Med**, n. 373, v. 5, p. 456-466, 2015. doi: 10.1056/NEJMra1410150.
- BRANCO, B.H.M.; ARAÚJO, S.M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Prevenção primária da toxoplasmose: conhecimento e atitudes de profissionais de saúde e gestantes do serviço público de Maringá, estado do Paraná. **Scientia Medica (Porto Alegre)**, v. 22, n. 4, p. 185-190, 2012.
- BRANSON, B.M. Point-of-care Rapid Tests for HIV Antibodies. **J Lab Med**, v. 27 (7/8), p. 288-295. 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0477.2003.03049.x>.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 206, de 17 de novembro de 2006. Estabelece regulamento técnico de produtos para diagnóstico de uso in vitro e seu registro, cadastramento, e suas alterações, revalidações e cancelamento. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 221, p. 36-38, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso brasileiro em doença de Chagas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38 (supl. III), p. 12-14, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 1ª ed. 2016. Disponível em <bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf>. Acesso em jan 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Teste Rápido - porque não? Estudos que contribuíram para a política de ampliação da testagem para o HIV no Brasil**. p. 29-30, 2007.
- CAMARGO, M.A. **Metodologia de desenvolvimento e validação de kit imunocromatográfico adotando como modelo o teste rápido para detecção do Hormônio Luteinizante (LH)**. 2015. 147 f. Tese (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Parasites – American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em jan 2017.

- CHAPPUIS, F. et al. Validation of a rapid immunochromatographic assay for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection among Latin-American migrants in Geneva, Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2948–2952, 2010. doi: 10.1128/JCM.00774-10.
- CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98-103, 2017. doi: 10.1016/j.csbj.2016.12.002.
- COHEN, J. A coefficient agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, p. 37-46, 1960.
- DRUG FOR NEGLECTED DISEASES *INITIATIVE*. **Inovações para pacientes negligenciados**. Relatório anual 2012-2013. 2013. Disponível em: <http://www.dndial.org/images/stories/pdf/relatorio_LA_2012_2013.pdf>. Acesso em 17 nov. 2015.
- DUARTE, L. F. et al. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. **Colombia médica (Cali, Colombia)**, v. 45, n. 2, p. 61–6, 2014.
- EGÜEZ, K.E. et al. Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. **PLoS Negl Trop Dis**, n. 11, v. 4, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005501>.
- FABBRO, D.L. et al. Trypanocide Treatment of Women Infected with *Trypanosoma cruzi* and Its Effect on Preventing Congenital Chagas. **PLoS Negl Trop Dis**, n. 11, v. 8, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003312>.
- FLEISS, J.L.; LEVIN, B.; PAIK, M.C. **Statistical Methods for Rates and Proportions**.3^a ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2003.
- FLORES-CHÁVEZ, M. et al. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, vol. 28, p. 284-293, 2010. doi: 10.1016/j.eimc.2009.07.005.
- FLORES-CHAVEZ, M. et al. 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. **Clin Vaccine Immunol.**, vol. 19, n. 9, p. 1353-1359, 2012. doi: 10.1128/CVI.00227-12.
- GALVÁN-RAMÍREZ, M.L. et al. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens with sera from toxoplasmosis patients. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 3, p. 271-277, 1998.
- GOLD ELISA CHAGAS. São Paulo: REM Indústria e Comércio Ltda., 2013. Instruções de uso.

- GOMES, Y.M.; LORENA, V. MB.; LUQUETTI, A.O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104 (suppl. I), p. 115-121, 2009.
- IMUNO-CON CHAGAS. São Carlos: WAMA Diagnóstica, 2013. Instruções de uso.
- KLEIN, C.H.; COSTA, E.A. Os erros de classificação e os resultados de estudos epidemiológicos. **Cad Saúde Pública**, v. 3, n. 3, p. 236-249, 1987. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1987000300003>.
- KOCZULA, K. M.; GALLOTTA, A. Lateral flow assays. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. June, p. 111–120, 2016. doi: 10.1042/EBC20150012.
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.
- LEE, B.Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infect Dis.**, v. 13(4), p. 342-348, 2013. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70002-1.
- MARKETS AND MARKETS. **Lateral Flow Assay Market worth 6.78 billion USD by 2020**. 2016. Disponível em: <<http://www.prnewswire.com/news-releases/lateral-flow-assay-market-worth-678-billion-usd-by-2020-571780201.html>>. Acesso em jan 2018.
- MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p. 167-174, 2014. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.10.002.
- MERCALDO, N.D.; LAU, K.F.; ZHOU, X.H. Confidence intervals for predictive values with na emphasis to case-control studies. **Stat Med**, v. 26, n. 10, p. 2170-2183, 2007.
- O'FARRELL, B. Evolution in Lateral Flow-Based Immunoassay Systems. In: WONG, R.C. and TSE, H.Y (eds.). **Lateral Flow Immunoassay**. New York: Humana Press, p. 1-2, 2009.
- O'FARRELL, B. Lateral flow immunoassay systems: Evolution from the current state of the art to the next generation of highly sensitive, quantitative rapid assays. In: WILD, D. G. (ed.). **The Immunoassay Handbook**. 4. ed. New York: Elsevier, 2013. cap. 24, p. 89-107.
- PEREIRA, G.A. et al. Performance of six diagnostic tests to screen for Chagas disease in blood banks and prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among donors with inconclusive serology screening based on the analysis of epidemiological variables. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 34, n. 4, p. 292-297, 2012. doi: 10.5581/1516-8484.20120074.
- PONCE, C. et al. Validation of a Rapid and Reliable Test for Diagnosis of Chagas' Disease by Detection of *Trypanosoma cruzi*-Specific Antibodies in Blood of Donors and Patients in Central America. **J. of Clin. Microb.**, v. 43, p. 5065-5068, 2005. doi: 10.1128/JCM.43.10.5065-5068.2005

- PORRÁS, A.I. et al. Target Product Profile (TPP) for Chagas Disease Point-of-Care Diagnosis and Assessment of Response to Treatment. **PLoS Negl Trop Dis**, n. 9, v. 6, 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0003697.
- POSTHUMA-TRUMPIE, G. A.; KORF, J.; VAN AMERONGEN, A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 393, p. 569-582, 2009. doi: 10.1007/s00216-008-2287-2.
- RASSI JR, A.; RASSI, A. MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.
- RASSI JR., A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.
- REITHINGER, R. et al. Rapid Detection of *Trypanosoma cruzi* in Human Serum by Use of a Immunochromatographic Dipstick Test. **J. of Clinical Microb.**, v. 48, p. 3003-3007, 2010. doi:10.1128/JCM.02474-09.
- ROSEN, S. Market Trend in Lateral Flow Immunoassays. In: WONG, R.C. e TSE, H.Y (eds.). **Lateral Flow Immunoassay**. New York: Humana Press, p. 35-49, 2009.
- SAJID, M.; KAWDE, A.; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. **J of Saudi Chem Soc**, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.09.001>.
- SÁNCHEZ-CAMARGO, C. L. et al. Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. **J of Clin Microb**, v. 52, n. 7, p. 2506–2512, 2014. doi: 10.1128/JCM.00144-14.
- SHARMA, S. et al. Point-of-Care Diagnostics in Low Resource Settings: Present Status and Future Role of Microfluidics. **Biosensors**, v. 5, p. 577-601, 2015. doi: 10.3390/bios5030577.
- ŠIMUNDIĆ, A.-M. Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. **EJIFCC**, v.19, n. 4, p. 203–211, 2009.
- TARLETON, R.L. *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease: Cause and Effect. In: TYLER K.M. e MILES, M.A. (eds) **American Trypanosomiasis**. Boston: Springfield, 2003.p. 107-115.
- TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463–491, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000500001>.
- VERANI, J.R. et al. Geographic Variation in the Sensitivity of Recombinant Antigen-based Rapid Tests for Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.80, n. 3, p. 410-415, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of two International Reference Standards for antibodies to *Trypanosoma cruzi* in a WHO collaborative study. **Report**. Geneva, 2011. (Expert Committee on biological standardization).

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas Disease: second report of the WHO expert committee.** Hong Kong: s.n., 2002. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42443/1/WHO_TRS_905.pdf>. Acesso em 13 fev 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases.** Geneva: s.n., 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/1/9789241564090_eng.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases.** Geneva: s.n., 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 17 fev 2018.
- YOU DEN, W.J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v. 3, p. 35-35, 1950.
- ZINGALES, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 240-253, 2012. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.009.

APÊNDICE A – Listagem das amostras utilizadas para análise de sensibilidade e especificidade clínicas.

Tabela 14- Listagem das amostras utilizadas para análise de sensibilidade e especificidade clínicas e os resultados obtidos utilizando as metodologias de IFI e ELISA e os kits Imuno-Rápido Chagas e *Comercial A*.

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	<i>Comercial A</i>
197364	Reagente	Reagente	Reagente
182596	Reagente	Reagente	Reagente
182511	Reagente	Reagente	Reagente
184204	Reagente	Reagente	Reagente
185522	Reagente	Reagente	Reagente
2+	Reagente	Reagente	Reagente
CRN	NR	NR	NR
EDL	NR	NR	NR
LLN	NR	NR	NR
RNT	NR	NR	NR
CAM	NR	NR	NR
ADR	NR	NR	NR
RDG	NR	NR	NR
4+	Reagente	Reagente	Reagente
10+	Reagente	Reagente	Reagente
MG01	Reagente	Reagente	Reagente
MG02	Reagente	Reagente	Reagente
MG03	Reagente	Reagente	Reagente
MG04	Reagente	Reagente	Reagente
MG05	Reagente	Reagente	Reagente
MG06	Reagente	Reagente	Reagente
MG07	Reagente	Reagente	Reagente
MG08	Reagente	Reagente	Reagente
MG09	Reagente	Reagente	Reagente
MG10	Reagente	Reagente	Reagente
MG11	Reagente	Reagente	Reagente
MG12	Reagente	Reagente	Reagente
MG13	Reagente	Reagente	Reagente
MG14	Reagente	Reagente	Reagente
MG15	Reagente	Reagente	Reagente
MIF	NR	NR	NR
MAC	NR	NR	NR
JLA	NR	NR	NR
continua			

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
PRL	NR	NR	NR
SDR	NR	NR	NR
LCN	NR	NR	NR
LLN	NR	NR	NR
KRN	NR	NR	NR
SLV	NR	NR	NR
FDR	NR	NR	NR
MRA	NR	NR	NR
EVL	NR	NR	NR
112807-8	NR	NR	NR
139967	NR	NR	NR
MG16	Reagente	Reagente	Reagente
MG17	Reagente	Reagente	Reagente
MG18	Reagente	Reagente	Reagente
MG19	Reagente	Reagente	Reagente
MG20	Reagente	Reagente	Reagente
MG21	Reagente	Reagente	Reagente
MG22	Reagente	Reagente	Reagente
MG23	Reagente	Reagente	Reagente
MG24	Reagente	Reagente	Reagente
MG26	Reagente	Reagente	Reagente
MG27	Reagente	Reagente	Reagente
MG28	Reagente	Reagente	Reagente
MG29	Reagente	Reagente	Reagente
MG30	Reagente	Reagente	Reagente
MG31	Reagente	Reagente	Reagente
MG32	Reagente	Reagente	Reagente
MG33	Reagente	Reagente	Reagente
MG34	Reagente	Reagente	Reagente
MG35	Reagente	Reagente	Reagente
MG36	Reagente	Reagente	Reagente
MG37	Reagente	Reagente	Reagente
MG38	Reagente	Reagente	Reagente
MG39	Reagente	Reagente	Reagente
MG40	Reagente	Reagente	Reagente
MG41	Reagente	Reagente	Reagente
MG42	Reagente	Reagente	Reagente
MG43	Reagente	Reagente	Reagente
MG44	Reagente	Reagente	Reagente
MG45	Reagente	NR	NR
MG46	Reagente	Reagente	Reagente

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
RSL	NR	NR	NR
DNL	NR	NR	NR
MIV	NR	NR	NR
RSN	NR	NR	NR
DIN	NR	NR	NR
NSA	NR	NR	NR
LLI	NR	NR	NR
ALR	NR	NR	NR
ELN	NR	NR	NR
GLR	NR	NR	NR
812	NR	NR	NR
803	NR	NR	NR
816	NR	NR	NR
801	NR	NR	NR
806	NR	NR	NR
802	NR	NR	NR
803	NR	NR	NR
811	NR	NR	NR
805	NR	NR	NR
802	NR	NR	NR
MG47	Reagente	Reagente	Reagente
MG48	Reagente	Reagente	Reagente
MG49	Reagente	Reagente	Reagente
MG50	Reagente	Reagente	Reagente
MG51	Reagente	Reagente	Reagente
MG52	Reagente	Fracamente Reagente	Reagente
MG53	Reagente	Reagente	Reagente
MG54	Reagente	Reagente	Reagente
MG55	Reagente	Reagente	Reagente
MG56	Reagente	Reagente	Reagente
MG57	Reagente	Reagente	Reagente
MG58	Reagente	Reagente	Reagente
MG59	Reagente	Reagente	Reagente
MG60	Reagente	Reagente	Reagente
MG61	Reagente	Fracamente Reagente	Fracamente Reagente
MG62	Reagente	Fracamente Reagente	Fracamente Reagente
MG63	Reagente	Reagente	Reagente
MG64	Reagente	Reagente	Reagente
MG65	Reagente	Reagente	Reagente
MG66	Reagente	Reagente	Reagente
MG67	Reagente	Fracamente Reagente	Fracamente Reagente

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
MG68	Reagente	Reagente	Reagente
MG69	Reagente	Reagente	Reagente
MG70	Reagente	Reagente	Reagente
MG71	Reagente	Reagente	Reagente
MG72	Reagente	Reagente	Reagente
MG73	Reagente	Reagente	Reagente
MG74	Reagente	Reagente	Reagente
MG75	Reagente	Reagente	Reagente
MG76	Reagente	Fracamente Reagente	Reagente
MG77	Reagente	Reagente	Reagente
MG78	Reagente	Fracamente Reagente	Reagente
MG79	Reagente	Reagente	Reagente
MG80	Reagente	Reagente	Reagente
MG81	Reagente	Reagente	Reagente
MG82	Reagente	Reagente	Reagente
MG83	Reagente	Reagente	Reagente
MG84	Reagente	Fracamente Reagente	Reagente
MG85	Reagente	Reagente	Reagente
MG86	Reagente	Fracamente Reagente	Reagente
MG87	Reagente	Reagente	Reagente
MG88	Reagente	Reagente	Reagente
MG89	Reagente	Reagente	Reagente
MG90	Reagente	Reagente	Reagente
MG91	Reagente	Reagente	Reagente
MG92	Reagente	NR	Reagente
MG93	Reagente	Reagente	Reagente
MG95	Reagente	Reagente	Reagente
MG97	Reagente	Reagente	Reagente
MG98	Reagente	Reagente	Reagente
MG99	Reagente	Fracamente Reagente	Reagente
MG100	Reagente	Reagente	Reagente
MG101	Reagente	Reagente	Reagente
MG102	Reagente	Reagente	Reagente
MG103	Reagente	Reagente	Reagente
MG104	Reagente	Reagente	Reagente
MG105	Reagente	Reagente	Reagente
MG106	Reagente	Reagente	Reagente
MG107	Reagente	Reagente	Reagente
MG108	Reagente	Reagente	Reagente
MG109	Reagente	Reagente	Reagente
MG110	Reagente	Reagente	Reagente

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
MG111	Reagente	Reagente	Reagente
MG112	Reagente	Reagente	Reagente
MG113	Reagente	Reagente	Reagente
MG114	NR	NR	NR
MG115	NR	NR	NR
MG116	NR	NR	NR
MG117	NR	NR	NR
MG118	NR	NR	NR
MG119	NR	NR	NR
MG120	NR	NR	NR
MG121	NR	NR	NR
MG122	NR	NR	NR
MG123	NR	NR	NR
MG124	NR	NR	NR
MG125	NR	NR	NR
MG126	NR	NR	NR
MG127	NR	NR	NR
MG128	NR	NR	NR
MG129	NR	NR	NR
MG130	NR	NR	NR
MG131	NR	NR	NR
MG132	NR	NR	NR
MG133	NR	NR	NR
MG134	NR	NR	NR
MG135	NR	NR	NR
MG136	NR	NR	NR
1 (PNCQ: 354)	NR	NR	NR
2 (PNCQ: 354)	NR	NR	NR
3 (PNCQ: 354)	NR	NR	NR
4 (PNCQ: 354)	NR	NR	NR
5 (PNCQ: 354)	Reagente	Reagente	Reagente
6 (PNCQ: 354)	NR	NR	NR
7 (PNCQ: 355)	NR	NR	NR
8 (PNCQ: 355)	NR	NR	NR
9 (PNCQ: 355)	NR	NR	NR
10 (PNCQ: 355)	Reagente	Reagente	Reagente
11 (PNCQ: 355)	NR	NR	NR
12 (PNCQ: 355)	NR	NR	NR
13 (PNCQ: 356)	NR	NR	NR
14 (PNCQ: 356)	Reagente	Reagente	Reagente
15 (PNCQ: 356)	NR	NR	NR

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
16 (PNCQ: 356)	NR	NR	NR
17 (PNCQ: 356)	NR	NR	NR
18 (PNCQ: 356)	NR	NR	NR
1 (PNCQ: 360)	NR	NR	NR
2 (PNCQ: 360)	NR	NR	NR
3 (PNCQ: 360)	NR	NR	NR
4 (PNCQ: 360)	Reagente	Reagente	Reagente
5 (PNCQ: 360)	NR	NR	NR
6 (PNCQ: 360)	NR	NR	NR
7 (PNCQ: 361)	NR	NR	NR
8 (PNCQ: 361)	NR	NR	NR
9 (PNCQ: 361)	NR	NR	NR
10 (PNCQ: 361)	NR	NR	NR
11 (PNCQ: 361)	NR	NR	NR
12 (PNCQ: 361)	Reagente	Reagente	Reagente
13 (PNCQ: 362)	Reagente	Reagente	Reagente
14 (PNCQ: 362)	NR	NR	NR
15 (PNCQ: 362)	NR	NR	NR
16 (PNCQ: 362)	NR	NR	NR
17 (PNCQ: 362)	NR	NR	NR
18 (PNCQ: 362)	NR	NR	NR
1 (PNCQ: 363)	NR	NR	NR
2 (PNCQ: 363)	NR	NR	NR
3 (PNCQ: 363)	NR	NR	NR
4 (PNCQ: 363)	Reagente	Reagente	Reagente
5 (PNCQ: 363)	NR	NR	NR
6 (PNCQ: 363)	NR	NR	NR
7 (PNCQ: 364)	NR	NR	NR
8 (PNCQ: 364)	NR	NR	NR
9 (PNCQ: 364)	NR	NR	NR
10 (PNCQ: 364)	Reagente	Reagente	Reagente
11 (PNCQ: 364)	NR	NR	NR
12 (PNCQ: 364)	NR	NR	NR
13 (PNCQ: 365)	NR	NR	NR
14 (PNCQ: 365)	Reagente	Reagente	Reagente
15 (PNCQ: 365)	NR	NR	NR
16 (PNCQ: 365)	NR	NR	NR
17 (PNCQ: 365)	NR	NR	NR
18 (PNCQ: 365)	NR	NR	NR
1 (PNCQ: 366)	Reagente	Reagente	Reagente
2 (PNCQ: 366)	NR	NR	NR
			continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
3 (PNCQ: 366)	NR	NR	NR
4 (PNCQ: 366)	NR	NR	NR
5 (PNCQ: 366)	NR	NR	NR
6 (PNCQ: 366)	NR	NR	NR
7 (PNCQ: 367)	NR	NR	NR
8 (PNCQ: 367)	NR	NR	NR
9 (PNCQ: 367)	Reagente	Reagente	Reagente
10 (PNCQ: 367)	NR	NR	NR
11 (PNCQ: 367)	NR	NR	NR
12 (PNCQ: 367)	NR	NR	NR
13 (PNCQ: 368)	NR	NR	NR
14 (PNCQ: 368)	NR	NR	NR
15 (PNCQ: 368)	NR	NR	NR
16 (PNCQ: 368)	NR	NR	NR
17 (PNCQ: 368)	Reagente	Reagente	Reagente
18 (PNCQ: 368)	NR	NR	NR
1 (PNCQ: 369)	NR	NR	NR
2(PNCQ: 369)	NR	NR	NR
3 (PNCQ: 369)	Reagente	Reagente	Reagente
4 (PNCQ: 369)	NR	NR	NR
5 (PNCQ: 369)	NR	NR	NR
6 (PNCQ: 369)	NR	NR	NR
7 (PNCQ: 370)	NR	NR	NR
8 (PNCQ: 370)	NR	NR	NR
9 (PNCQ: 370)	NR	NR	NR
10 (PNCQ: 370)	NR	NR	NR
11 (PNCQ: 370)	NR	NR	NR
12 (PNCQ: 370)	Reagente	Reagente	Reagente
13 (PNCQ: 371)	Reagente	Reagente	Reagente
14 (PNCQ: 371)	NR	NR	NR
15 (PNCQ: 371)	NR	NR	NR
16 (PNCQ: 371)	NR	NR	NR
17 (PNCQ: 371)	NR	NR	NR
18 (PNCQ: 371)	NR	NR	NR
1 (PNCQ: 372)	NR	NR	NR
2 (PNCQ: 372)	NR	NR	NR
3 (PNCQ: 372)	NR	NR	NR
4 (PNCQ: 372)	NR	NR	NR
5 (PNCQ: 372)	Reagente	Reagente	Reagente
6 (PNCQ: 372)	NR	NR	NR
1 (PNCQ: 375)	NR	NR	NR

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
2 (PNCQ: 375)	NR	NR	NR
3 (PNCQ: 375)	Reagente	Reagente	Reagente
4 (PNCQ: 375)	NR	NR	NR
5 (PNCQ: 375)	NR	NR	NR
6 (PNCQ: 375)	NR	NR	NR
1 (PNCQ: 384)	NR	NR	NR
2 (PNCQ: 384)	NR	NR	NR
3 (PNCQ: 384)	Reagente	Reagente	Reagente
4 (PNCQ: 384)	NR	NR	NR
5 (PNCQ: 384)	NR	NR	NR
6 (PNCQ: 384)	NR	NR	NR
7 (PNCQ: 385)	NR	NR	NR
8 (PNCQ: 385)	NR	NR	NR
9 (PNCQ: 385)	NR	NR	NR
10 (PNCQ: 385)	NR	NR	NR
11 (PNCQ: 385)	Reagente	Reagente	Reagente
12 (PNCQ: 385)	NR	NR	NR
13 (PNCQ: 386)	NR	NR	NR
14 (PNCQ: 386)	Reagente	Reagente	Reagente
15 (PNCQ: 386)	NR	NR	NR
16 (PNCQ: 386)	NR	NR	NR
17 (PNCQ: 386)	NR	NR	NR
18 (PNCQ: 386)	NR	NR	NR
13 (PNCQ: 377)	NR	NR	NR
14 (PNCQ: 377)	NR	NR	NR
15 (PNCQ: 377)	NR	NR	NR
16 (PNCQ: 377)	NR	NR	NR
17 (PNCQ: 377)	NR	NR	NR
18 (PNCQ: 377)	Reagente	Reagente	Reagente
1 (PNCQ: 378)	Reagente	Reagente	Reagente
2 (PNCQ: 378)	NR	NR	NR
3 (PNCQ: 378)	NR	NR	NR
4 (PNCQ: 378)	NR	NR	NR
5 (PNCQ: 378)	NR	NR	NR
6 (PNCQ: 378)	NR	NR	NR
7 (PNCQ: 379)	NR	NR	NR
8 (PNCQ: 379)	NR	NR	NR
9 (PNCQ: 379)	NR	NR	NR
10 (PNCQ: 379)	NR	NR	NR
11 (PNCQ: 379)	NR	NR	NR
12 (PNCQ: 379)	Reagente	Reagente	Reagente continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
13 (PNCQ: 380)	NR	NR	NR
14 (PNCQ: 380)	NR	NR	NR
15 (PNCQ: 380)	NR	NR	NR
16(PNCQ: 380)	NR	NR	NR
17 (PNCQ: 380)	Reagente	Reagente	Reagente
18 (PNCQ: 380)	NR	NR	NR
1 (PNCQ 381)	NR	NR	NR
2 (PNCQ 381)	NR	NR	NR
3 (PNCQ 381)	NR	NR	NR
4 (PNCQ 381)	Reagente	Reagente	Reagente
5 (PNCQ 381)	NR	NR	NR
6 (PNCQ 381)	NR	NR	NR
7 (PNCQ 382)	NR	NR	NR
8 (PNCQ 382)	NR	NR	NR
9 (PNCQ 382)	Reagente	Reagente	Reagente
10 (PNCQ 382)	NR	NR	NR
11 (PNCQ 382)	NR	NR	NR
12 (PNCQ 382)	NR	NR	NR
13 (PNCQ 383)	NR	NR	NR
14 (PNCQ 383)	NR	NR	NR
15 (PNCQ 383)	NR	NR	NR
16 (PNCQ 383)	NR	NR	NR
17 (PNCQ 383)	NR	NR	NR
18 (PNCQ 383)	Reagente	Reagente	Reagente
1 (PNCQ 357)	NR	NR	NR
2 (PNCQ 357)	NR	NR	NR
3 (PNCQ 357)	NR	NR	NR
4 (PNCQ 357)	NR	NR	NR
5 (PNCQ 357)	Reagente	Reagente	Reagente
6 (PNCQ 357)	NR	NR	NR
7 (PNCQ 358)	NR	NR	NR
8 (PNCQ 358)	NR	NR	NR
9 (PNCQ 358)	NR	NR	NR
10 (PNCQ 358)	NR	NR	NR
11 (PNCQ 358)	Reagente	Reagente	Reagente
12 (PNCQ 358)	NR	NR	NR
13 (PNCQ 359)	Reagente	Reagente	Reagente
14 (PNCQ 359)	NR	NR	NR
15 (PNCQ 359)	NR	NR	NR
16 (PNCQ 359)	NR	NR	NR
17 (PNCQ 359)	NR	NR	NR

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
18 (PNCQ 359)	NR	NR	NR
7 (PNCQ 373)	NR	NR	NR
8 (PNCQ 373)	NR	NR	NR
9 (PNCQ 373)	NR	NR	NR
10 (PNCQ 373)	Reagente	Reagente	Reagente
11 (PNCQ 373)	NR	NR	NR
12 (PNCQ 373)	NR	NR	NR
13 (PNCQ 374)	NR	NR	NR
14 (PNCQ 374)	Reagente	Reagente	Reagente
15 (PNCQ 374)	NR	NR	NR
16 (PNCQ 374)	NR	NR	NR
17 (PNCQ 374)	NR	NR	NR
18 (PNCQ 374)	NR	NR	NR
7 (PNCQ 376)	NR	NR	NR
8 (PNCQ 376)	NR	NR	NR
9 (PNCQ 376)	NR	NR	NR
10 (PNCQ 376)	Reagente	Reagente	Reagente
11 (PNCQ 376)	NR	NR	NR
12 (PNCQ 376)	NR	NR	NR
524 (14/11)	Reagente	Reagente	Reagente
002110RP	Reagente	Reagente	Reagente
002RP	Reagente	Reagente	Reagente
003RP	Reagente	Reagente	Reagente
2405 - 1007	Reagente	Reagente	Reagente
910330161754	Reagente	Reagente	Reagente
910592394854	Reagente	Reagente	Reagente
908022148754	Reagente	Reagente	Reagente
910592361554	Reagente	Reagente	Reagente
908051221454	Reagente	Reagente	Reagente
910592364354	Reagente	Reagente	Reagente
1105 - 80185	Reagente	Reagente	Reagente
2906 - 1178	Reagente	Reagente	Reagente
2405 - 90034	Reagente	Reagente	Reagente
1205 - 91220	Reagente	Reagente	Reagente
911830060254	Reagente	Reagente	Reagente
56 - 80044	Reagente	Reagente	Reagente
80025	Reagente	Reagente	Reagente
91030	Reagente	Reagente	Reagente
907400600354	Reagente	Reagente	Reagente
OK1	Reagente	Reagente	
OK2	Reagente	Reagente	

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
OK3	Reagente	Reagente	
OK4	Reagente	Reagente	
OK5	Reagente	Reagente	
OK6	Reagente	Reagente	
OK7	Reagente	Reagente	
OK8	Reagente	Reagente	
OK9	Reagente	Reagente	
OK10	Reagente	Reagente	
OK11	Reagente	Reagente	
OK12	Reagente	Reagente	
OK13	Reagente	Reagente	
OK14	Reagente	Reagente	
OK15	Reagente	Reagente	
OK16	Reagente	Reagente	
OK17	Reagente	Reagente	
OK18	Reagente	Reagente	
OK19	Reagente	Reagente	
OK20	Reagente	Reagente	
OK21	Reagente	Reagente	
OK22	Reagente	Reagente	
OK23	Reagente	Reagente	
OK25	Reagente	Reagente	
57C	Reagente	Reagente	
58C	Reagente	Reagente	
59C	Reagente	Reagente	
60C	Reagente	Reagente	
61C	Reagente	Reagente	
62C	Reagente	Reagente	
63C	Reagente	Reagente	
64C	Reagente	Reagente	
65C	Reagente	Reagente	
66C	NR	NR	
67C	Reagente	Reagente	
68C	NR	NR	
69C	Reagente	Reagente	
70C	Reagente	Reagente	
71C	Reagente	Reagente	
72C	Reagente	Reagente	
74C	Reagente	Reagente	
75C	Reagente	Reagente	
76C	Reagente	Reagente	

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
77C	Reagente	Reagente	
78C	Reagente	Reagente	
79C	Reagente	Reagente	
80C	Reagente	Reagente	
17C	Reagente	Reagente	
18C	Reagente	Reagente	
19C	Reagente	Reagente	
20C	Reagente	Reagente	
21C	Reagente	Reagente	
22C	Reagente	Reagente	
23C	Reagente	Reagente	
24C	Reagente	Reagente	
25C	Reagente	Reagente	
27C	Reagente	Reagente	
28C	Reagente	Reagente	
29C	Reagente	Reagente	
SF3+	Reagente	Reagente	
1+	Reagente	Reagente	
3+	Reagente	Reagente	
4+	Reagente	Reagente	
5+	Reagente	Reagente	
6+	Reagente	Reagente	
7+	Reagente	Reagente	
8+	Reagente	Reagente	
31C	Reagente	Reagente	
32C	Reagente	Reagente	
33C	Reagente	Reagente	
34C	Reagente	Reagente	
35C	Reagente	Reagente	
36C	Reagente	Reagente	
37C	Reagente	Reagente	
38C	Reagente	Reagente	
41C	Reagente	Reagente	
42C	Reagente	Reagente	
43C	Reagente	Reagente	
44C	Reagente	Reagente	
9+	Reagente	Reagente	
80032	Reagente	Reagente	
91016	Reagente	Reagente	
OK24	Reagente	Reagente	
80020	Reagente	Reagente	

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
A (21)	Reagente	Reagente	
712	Reagente	Reagente	
13	Reagente	Reagente	
6+	Reagente	Reagente	
7+	Reagente	Reagente	
81C	Reagente	Reagente	
82C	Reagente	Reagente	
83C	Reagente	Reagente	
84C	Reagente	Reagente	
85C	Reagente	Reagente	
86C	Reagente	Reagente	
87C	Reagente	Reagente	
88C	Reagente	Reagente	
89C	Reagente	NR	Reagente
SF 70	NR	NR	
SF 71	NR	NR	
SF 72	NR	NR	
SF 73	NR	NR	
SF 74	NR	NR	
SF 75	NR	NR	
SF 76	NR	NR	
SF 77	NR	NR	
SF 78	NR	NR	
SF 79	NR	NR	
SF 80	NR	NR	
SF 81	NR	NR	
SF83	NR	NR	
SF84	NR	NR	
SF85	NR	NR	
SF86	NR	NR	
SF87	NR	NR	
SF88	NR	NR	
SF89	NR	NR	
SF90	NR	NR	
SF82	NR	NR	
SF91	NR	NR	
SF93	NR	NR	
SF94	NR	NR	
SF95	NR	NR	
SF96	NR	NR	
SF97	NR	NR	

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
SF98	NR	NR	
SF99	NR	NR	
SF100	NR	NR	
SF 1	NR	NR	NR
SF 2	NR	NR	
SF 3	NR	NR	
SF 4	NR	NR	
SF 5	NR	NR	
SF 6	NR	NR	
SF 7	NR	NR	NR
SF 8	NR	NR	
SF 9	NR	NR	Fracamente Reagente
SF 10	NR	NR	
SF 11	NR	NR	
SF 12	NR	NR	
SF 13	NR	NR	
SF 14	NR	NR	
SF 15	NR	NR	
SF 16	NR	NR	
SF 17	NR	NR	
SF 18	NR	NR	
SF 19	NR	NR	
SF 20	NR	NR	
SF 21	NR	NR	
SF 22	NR	NR	
SF 23	NR	NR	
SF 24	NR	NR	
SF 25	NR	NR	
SF 26	NR	NR	
SF 27	NR	NR	
SF 28	NR	NR	NR
SF 29	NR	NR	
SF 30	NR	NR	
SF 31	NR	NR	
SF 32	NR	NR	
SF 33	NR	NR	
SF 34	NR	NR	
SF 35	NR	NR	
SF 36	NR	NR	
SF 47	NR	NR	
SF 48	NR	NR	

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
SF 49	NR	NR	
SF 51	NR	NR	
SF 52	NR	NR	
SF 53	NR	NR	
SF 54	NR	NR	
SF 55	NR	Fracamente Reagente	
SF 56	NR		
SF 57	NR	NR	
SF 58	NR	NR	
SF 59	NR	NR	
SF 60	NR	NR	
SF 61	NR	NR	
SF 62	NR	NR	
SF 63	NR	NR	
SF 64	NR	NR	
SF 65	NR	NR	
SF 66	NR	NR	
SF 67	NR	NR	
SF 68	NR	NR	
SF 69	NR	NR	
SF 37	NR	NR	
SF 38	NR	NR	
SF 39	NR	NR	
SF 40	NR	NR	
SF 41	NR	NR	
SF 42	NR	NR	
SF 43	NR	NR	
SF 44	NR	NR	
SF 45	NR	NR	
SF 50	NR	NR	
SF CQ 20	NR	NR	
SF CQ 25	NR	NR	
SF CQ 27	NR	NR	
SF CQ 41	NR	NR	
SF CQ 4	NR	NR	
SF CQ 3	NR	NR	
SF CQ 19	NR	NR	
SF CQ 11	NR	NR	
SF CQ 12	NR	NR	
SF CQ 13	NR	NR	
SF CQ 14	NR	NR	

continua

continuação

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
SF CQ 15	NR	NR	
SF CQ 16	NR	NR	
SF CQ 17	NR	NR	
SF CQ 10	NR	NR	
SF CQ 21	NR	NR	
SF CQ 22	NR	NR	
SF CQ 23	NR	NR	
SF CQ 26	NR	NR	
SF CQ 18	NR	NR	
SF CQ 50	NR	NR	
SF CQ 32	NR	NR	
SF CQ 33	NR	NR	
SF CQ 34	NR	NR	
SF CQ 35	NR	NR	
SF CQ 36	NR	NR	
SF CQ 37	NR	NR	
SF CQ 38	NR	NR	
SF CQ 29	NR	NR	
SF CQ 46	NR	NR	
SF CQ 49	NR	NR	
SF CQ 42	NR	NR	
SF CQ 43	NR	NR	
SF CQ 44	NR	NR	
SF CQ 31	NR	NR	
SF CQ 47	NR	NR	
SF CQ 48	NR	NR	
SF CQ 2	NR	NR	
SF CQ 39	NR	NR	
SF CQ 40	NR	NR	
SF CQ 30	NR	NR	
SF CQ 46	NR	NR	
SF 25 FP	NR	NR	
SF 16 FP	NR	NR	
JYC	NR	NR	NR
LGA	NR	NR	NR
NLV	NR	NR	NR
FLV	NR	NR	NR
163006	NR	NR	NR
MG 146	NR	NR	
MG 147	NR	NR	
MG 148	NR	NR	

continua

conclusão

Amostra	ELISA/IFI	Imuno-Rápido Chagas	Comercial A
MG 149	NR	NR	
MG 137	NR	NR	
MG 138	NR	NR	
MG 139	NR	NR	
MG 140	NR	NR	
MG 141	NR	NR	
MG 142	NR	NR	
MG 143	NR	NR	
MG 144	NR	NR	
MG 145	NR	NR	
45C	Reagente	Reagente	
46C	Reagente	Reagente	
47C	Reagente	Reagente	
48C	Reagente	Reagente	
49C	Reagente	Reagente	
50C	Reagente	NR	
51C	Reagente	Reagente	
52C	Reagente	Reagente	
53C	Reagente	Reagente	
54C	Reagente	Reagente	
55C	Reagente	Reagente	
56C	Reagente	Reagente	
MG150	NR	NR	
MG151	NR	NR	
MG152	NR	NR	
MG153	NR	NR	
0611 - 27068	Reagente	Reagente	Reagente
2711 - 51069	Reagente	Reagente	Reagente
2906 - 1178	Reagente	Reagente	Reagente
0206 - 91030	Reagente	Reagente	Reagente
1111 - 907	Reagente	Reagente	Reagente
3110 - 22121	Reagente	Reagente	Reagente
3110 - 459	Reagente	Reagente	Reagente
0506 - 80044	Reagente	Reagente	Reagente
0606 - 361	Reagente	Reagente	Reagente
2405 - 90034	Reagente	Reagente	Reagente

APÊNDICE B – Amostras utilizadas na análise de interferentes e seus resultados.

Tabela 15 - Descrição das amostras utilizadas na análise de interferentes e os resultados obtidos utilizando o kit Imuno-Rápido Chagas e a técnica de imunofluorescência indireta.

Amostra	Patologia	Imuno-Rápido Chagas	Imunofluorescência indireta
1	Leishmaniose Tegumentar Americana	Reagente	Reagente
2	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Fracamente Reagente
3	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Fracamente Reagente
4	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Reagente
5	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	NR
6	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	NR
7	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Reagente
8	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	NR
9	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Reagente
10	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Reagente
11	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Reagente
12	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Fracamente Reagente
13	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	NR
14	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Reagente
15	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	NR
16	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Reagente
17	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Reagente
18	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	NR
19	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Reagente
20	Leishmaniose Tegumentar Americana	NR	Reagente

continua

conclusão

Amostra	Patologia	Imuno-Rápido Chagas	Imunofluorescência Indireta
21	Toxoplasmose IgG	NR	NR
22	Toxoplasmose IgG	NR	NR
23	Toxoplasmose IgG	NR	NR
24	Toxoplasmose IgG	NR	NR
25	Toxoplasmose IgG	NR	NR
26	Toxoplasmose IgG	NR	NR
27	Toxoplasmose IgG	NR	NR