



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0717597-3 A2



(22) Data de Depósito: 18/10/2007
(43) Data da Publicação: 05/11/2013
(RPI 2235)

(51) Int.Cl.:
G01N 33/553

(54) Título: MÉTODOS PARA A DETECÇÃO E
DIAGNOSE DE INFECÇÃO POR TRYPANOSOMA
CRUZI

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 19/10/2006 US 11/583.203

(73) Titular(es): Abbott Laboratories

(72) Inventor(es): Chi-Deu Chang, Dinesh O Shah, Gerald
Schochetman, Kevin Y Cheng

(74) Procurador(es): Alexandre Ferreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007081735 de
18/10/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/051782de
02/05/2008

“MÉTODOS PARA A DETECÇÃO E DIAGNOSE DE INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*”

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à diagnose de infecção por *Trypanosoma cruzi*. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a métodos de identificar e diagnosticar infecção por *Trypanosoma cruzi* usando uma nova combinação de quatro polipeptídeos recombinantes.

Fundamentos da Presente Invenção

Trypanosoma cruzi (“*T. cruzi*”), o parasita protozoário que causa doença de Chagas ou tripanossomíase Americana, é endêmico nas Américas Central e do Sul, assim como no México. A maioria das pessoas infectadas, depois de uma fase aguda branda, entra na fase indeterminada permanente que é caracterizada por uma carência dos sintomas, parasitemias baixas, e anticorpos para uma variedade de antígenos de *T. cruzi*. Aproximadamente 10 a 30 % de pessoas com infecções por *T. cruzi* crônicas, entretanto, desenvolvem disfunção cardíaca ou gastrointestinal como uma consequência da presença persistente do parasita. Quimioterapia é amplamente ineficaz, particularmente para infecções crônicas. Aproximadamente 25.000 das 12 milhões de pessoas estimadas nos países endêmicos são aquelas cronicamente infectadas com *T. cruzi* que morrem da enfermidade a cada ano, tipicamente devido a distúrbios do ritmo cardíaco ou insuficiência cardíaca congestiva (Veja, Kirchoff, L.V., “American trypanosomiasis (Chagas’ disease) in Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice, R.L. Guerrant *et al.*, editores, p. 1082-1094, Churchill Livingstone, New York 2006).

Em áreas endêmicas, *T. cruzi* é transmitido principalmente por insetos triatomíneos sugadores de sangue. A transmissão também pode ocorrer por transfusão de sangue doado por pessoas cronicamente infectadas, e historicamente, esta via de transmissão foi importante nos países endêmicos antes da implementação de programas de triagem de sangue (Veja, Schunis, G.A., *Clin. Microbiol. Rev.*, 18:12-29 (2000)). Não existe vacina para prevenir a transmissão de *T. cruzi*. Durante as últimas décadas, a emigração dos países endêmicos por Chagas para os Estados Unidos aumentou destacadamente. Aproximadamente 13 milhões de tais imigrantes agora vivem nos Estados Unidos, e uma população estimada de 80.000 a 120.000 está infectada com *T. cruzi* (Veja, Kirchoff, L.V., *et al.*, *Transfusion*, 46:298-304 (2006)). Sua presença gera um risco de transmissão relacionada à transfusão do parasita nos Estados Unidos. Cinco exemplos de doença de Chagas relacionada à transfusão já foram relatados nos Estados Unidos, e as autoridades de bancos de sangue concordam que um número muito maior de casos não diagnosticados provavelmente tem ocorrido (Veja, Leiby, DA., *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 341:1237-1239 (1999) e Young, CT., “Transfusion acquired *Trypanosoma cruzi* infection”, *Transfusion*, In press (2007)). Correntemente,

o estoque de sangue nos Estados Unidos não é triado para *T. cruzi*, como nenhum ensaio de triagem de sangue foi aprovado pela FDA. Consequentemente, a infecção por *T. cruzi* é uma ameaça ao estoque de sangue dos Estados Unidos. *T. cruzi* também pode ser transmitido por transplante de órgãos obtidos de pessoas cronicamente infectadas. Numerosos relatos de tal transmissão foram divulgados nos países endêmicos, e não está claro quantos não foram detectados nos Estados Unidos (Veja, Mascola, L., *et al.*, *MMWR*, 55:798-780 (2006) e Zayas, CF., *et al.*, *MMWP*, 51:210-212 (2001)).

A diagnose laboratorial de infecção por *T. cruzi* crônica é complexa. A demonstração do parasita por hemocultura ou xenodiagnose é demorada, insensível e cara. Ao contrário, ensaios sorológicos quanto a anticorpos para *T. cruzi* são satisfatoriamente apropriados para diagnose rápida e acessível da infecção. Testes convencionais, tais como ensaio de hemaglutinação indireta ("IHA"), ensaio de imunofluorescência indireta ("IFA"), e ensaio imunossorvente ligado por enzimas ("ELISA"), são amplamente usados nos países endêmicos. A maioria é fundamentada em frações antigênicas total ou semi-purificadas de epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em cultura axênica. Um problema persistente com os ensaios convencionais foi a ocorrência de resultados inconclusivos e falso-positivos (Almeida, I.C., *et al.*, *Transfusion*, 37:850-857 (1997), Kirchoff, L. V., *et al.*, *Transfusion*, 46:298-304 (2006) e Leiby, D.A., *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 38:639-642 (2000)). Não existe consenso sobre qual preparação de antígeno parasítico é melhor para detectar anticorpos para *T. cruzi*. A Pan American Health Organization e outros grupos experientes recomendaram que o sangue doado seja testado por pelo menos dois métodos diferentes conduzidos ao mesmo tempo (Veja, "Control of Chagas Disease", World Health Organization, Geneva (2000)). Este método carrega consigo um grande encargo logístico e econômico em relação aos bancos de sangue.

Assim, há uma necessidade na técnica quanto a um ensaio suplementar para o uso em laboratórios clínicos e bancos de sangue. Nenhum ensaio foi uniformemente aceito como o padrão ouro para a diagnose sorológica de infecção por *T. cruzi*. Ensaio com base em PCR carecem da sensibilidade necessária para este papel (Veja, Gomes, M.L., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60:205-210 (1999)). Um ensaio de radioimunoprecipitação ("RIPA"), o qual é um teste altamente sensível e específico com resultados facilmente interpretados foi desenvolvido há aproximadamente duas décadas e foi indicado para o uso como um teste confirmatório nos Estados Unidos (Veja, Kirchoff, L.V., *et al.*, *J. Infect. Dis* , 155:561-564 (1987)). Embora o RIPA tenha sido usado como um ensaio confirmatório em mais do que 20 projetos de pesquisa relatados até agora (Veja, Kirchoff, L.V., *et al.*, *Transfusion*, 46:298-304 (2006) e Leiby, D.A., *et al.*, *Transfusion*, 42:549-555 (2002)), sua sensibilidade e especificidade não foram sistematicamente validadas. Além disso, a complexidade do RIPA tornaria sua utilização difundida além das definições de difícil investigação (Veja, Leiby, D.A., *et al.*, *J*

Clin. Microbiol., 38:639-642 (2000)).

Ensaio imunoblot também foram estudados como testes suplementares em relação a anticorpos para *T. cruzi*. Há alguns anos, um ensaio imunoblot com base em uma fração de antígeno da proteína de *T. cruzi* proveniente de epimastigotas ligados a uma membrana de nitrocelulose foi proposto como um teste suplementar para doença de Chagas (Veja, Mendes, R.P., et al., *J. Clin. Microbiol.*, 35:1829-1834 (1997)). Um papel similar foi proposto para um ensaio imunoblot com base em uma fração de antígeno excretado-secretado por tripomastigota ("TESA") produzida em culturas de células de mamífero infectadas por *T. cruzi* (Veja, Berrizbeitia, M., et al., *J. Clin. Microbiol.*, 44:291-296 (2006), Umezawa, ES., *J. Clin. Microbiol.*, 34:2143-2147 (1996)). O risco biológico inerente em manipular culturas de parasitas vivos e a dificuldade de produzir estas misturas de antígeno complexas com consistência entre lotes são as principais desvantagens de ensaios com base em antígenos provenientes de cultura, tais como estes dois. Adicionalmente, nenhum destes testes foi adotado como um teste confirmatório e nenhum foi comercialmente desenvolvido. Um outro ensaio, isto é, o ensaio de Chagas INNO-LIA, contém sete bandas teste de domínio único para *T. cruzi* em uma tira de plástico. Entretanto, o fato de que sete antígenos recombinantes distintos estão presentes na tira pode ser um fator limitante em termos de sua sensibilidade. Além disso, sete bandas teste podem complicar o protocolo de interpretação.

Por isso, permanece uma necessidade na técnica quanto a um ensaio para *T. cruzi* que mostre um nível alto de sensibilidade e especificação, que seja de interpretação simples e que seja adequado para o uso como um teste confirmatório para espécimes clínicos e de bancos de sangue que são casos limites ou reativos em ensaios de triagem.

Sumário da Invenção

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um método de identificar *Trypanosoma cruzi* em uma amostra de teste. O método compreende as etapas de:

contatar uma amostra de teste de um ser humano com os quatro polipeptídeos recombinantes FP3, FP6, FP10 e TcF; e

detectar a ligação de anticorpos presentes na dita amostra de teste a pelo menos dois dos ditos polipeptídeos recombinantes, a presença da dita ligação dos ditos anticorpos a pelo menos dois dos ditos polipeptídeos recombinantes que indicam a presença de *Trypanosoma cruzi* na dita amostra de teste.

A amostra de teste contatada no método acima pode ser sangue, soro, plasma, saliva, fluido cérebro-espinhal, urina ou outra amostra apropriada. Adicionalmente, o método acima pode ainda compreender a etapa de contatar a amostra de teste com pelo menos um polipeptídeo recombinante adicional selecionado do grupo que consiste de JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 e SA85-1.1.

Em uma outra modalidade, a presente invenção refere-se a uma fase sólida tendo imobilizados nesta, quatro polipeptídeos recombinantes FP3, FP6, FP10 e TcF, e um primeiro controle e um segundo controle, em que o primeiro controle ou o segundo controle é imobilizado na fase sólida em uma concentração que é menor do que o outro controle.

5 Os polipeptídeos podem ser arranjados na fase sólida como bandas separadas (ou, por exemplo, como marcas ou pontos). A fase sólida pode ser selecionada do grupo que consiste de nitrocelulose, náilon, plástico e papel, ou outra fase sólida apropriada. Adicionalmente, a fase sólida pode ser uma tira tendo os ditos polipeptídeos imobilizados nesta. A fase sólida pode ter ainda imobilizado nesta pelo menos um polipeptídeo recombinante adicional selecionado do grupo que consiste de JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, 10 TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 e SA85-1.1.

Ainda em uma outra modalidade, a presente invenção refere-se a um método de diagnosticar *Trypanosoma cruzi* em um paciente. O método compreendendo as etapas de:

15 contatar uma amostra de teste obtida de um paciente com uma fase sólida, em que a dita fase sólida tem imobilizado nesta os quatro polipeptídeos recombinantes FP3, FP6, FP10 e TcF como bandas teste separadas, e um primeiro controle e um segundo controle, em que o primeiro controle ou o segundo controle é imobilizado na fase sólida em uma concentração que é menor do que o outro controle, de modo a compreender um controle baixo;

20 contatar a fase sólida com pelo menos um reagente de detecção;

detectar a ligação de anticorpos presentes na amostra de teste identificando-se a presença de um sinal em cada uma das bandas teste;

comparar a intensidade de qualquer sinal identificado em uma banda teste para um polipeptídeo recombinante com a intensidade do sinal do controle baixo;

25 em que a identificação de um sinal em pelo menos duas bandas teste dos polipeptídeos recombinantes indica a presença de *T. cruzi* na dita amostra de teste, contanto que pelo menos um dos sinais identificados em uma banda teste para um polipeptídeo recombinante tenha uma intensidade comparável àquela do controle baixo.

A amostra de teste contatada no método acima pode ser sangue, soro, plasma, saliva, fluido cérebro-espinhal, urina ou outra amostra apropriada. Os polipeptídeos imobilizados na fase sólida usada no método acima podem ser arranjados na fase sólida como bandas separadas (ou, por exemplo, como marcas ou pontos). Além disso, a fase sólida pode ser selecionada do grupo que consiste de nitrocelulose, náilon, plástico e papel, ou outra fase sólida apropriada. Adicionalmente, a fase sólida pode ser uma tira tendo os ditos polipeptídeos imobilizados nesta. A fase sólida pode ter ainda imobilizado nesta pelo menos um polipeptídeo recombinante adicional selecionado do grupo que consiste de JL8, TCR27, JL7, 30 TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, 35

CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 e SA85-1.1.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 mostra uma tira de immunoblot exemplar. Quatro (4) antígenos recombinantes (“rags”), FP3, FP6, FP10 e TcF, são utilizados como Bandas Teste para a detecção de anticorpos para *T. cruzi*. Três (3) bandas controle *in situ* (“CTL”), IgG anti-humana de cabra (“Anti-hlgG”), baixa hlgG (“hlgG-L”) e alta hlgG (“hlgG-H”) também podem ser usadas. IgG anti-humana de cabra é usada para verificar a adição de amostra, hlgG-L é usada para ajustar um corte para a intensidade da banda, e hlgG-H é usada como referência para bandas com intensidade mais alta. Os resultados antecipados usando a tira podem ser descritos como segue. Para um controle negativo, as três (3) bandas controle *in situ* são visíveis e nenhuma banda teste é visível. Para um controle positivo, além das três (3) bandas controle *in situ* sendo visíveis, as quatro (4) bandas teste também são visíveis.

A Figura 2 mostra os resultados típicos obtidos em um ensaio immunoblot exemplar da invenção em termos de reatividade com antígenos teste FP3, FP6, FP10 ou TcF ou antígenos controle hlgG-H, hlgG-L ou IgG anti-humana de cabra. A tira 1 é um controle negativo (“NC”), que mostra três bandas na seção controle *in situ* (Caixa A); a tira 2 é um controle positivo de anticorpo para *T. cruzi* (“PC”), que mostra quatro bandas teste (Caixa B) além das três bandas controle *in situ* (Caixa A); as tiras 3 a 6 mostram amostras contendo uma a quatro bandas teste (Caixa B) além das bandas controle *in situ* (Caixa A).

A Figura 3 é uma representação esquemática de um algoritmo exemplar para interpretar registros no ensaio immunoblot da presente invenção. As bandas teste são as bandas teste que são compreendidas dos antígenos recombinantes, FP10, FP6, FP3 e TcF. Para cada ensaio individual ser válido, as três bandas controle *in situ* também devem ser incluídas no immunoblot (por exemplo, devem estar presentes na tira) e devem ser detectadas pelo ensaio.

Descrição Detalhada da Presente Invenção

Definições

Conforme usado aqui, o termo “anticorpo” refere-se a uma molécula de imunoglobulina ou porção imunologicamente ativa desta, isto é, uma porção de ligação de antígeno. Exemplos de porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina incluem fragmentos F(ab) e F(ab')₂ que podem ser gerados tratando-se um anticorpo com uma enzima, tal como pepsina. Exemplos de anticorpos que podem ser usados na presente invenção são anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos recombinantes, Fvs de cadeia única (“scFv”), um anticorpo maturado por afinidade, anticorpos de cadeia única, anticorpos de domínio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs ligado a dissulfeto (“sdFv”), e anticorpos anti-idiotípicos (“anti-Id”) e fragmentos de ligação epítipo funcionalmente ativos de qualquer um

dos citados acima.

Conforme usado neste relatório, o termo “FP3” refere-se a um polipeptídeo de fusão recombinante (antígeno) derivado de *T. cruzi* tendo o domínio antigênico mostrado na Tabela 1 e a sequência de aminoácido mostrada na sequência da SEQ ID NO: 1. Métodos de preparar FP3 são descritos, por exemplo, na Publicação de Patente U.S. Nº 2004/0132077, os conteúdos desta sendo incorporados neste relatório como referência. O termo “FP3”, conforme usado neste relatório, também abrange variantes desta sequência de aminoácido que diferem em substituições e/ou modificações conservadoras.

Conforme usado neste relatório, o termo “FP6” refere-se a um polipeptídeo de fusão recombinante (antígeno) derivado de *T. cruzi* tendo o domínio antigênico mostrado na Tabela 1 e a sequência de aminoácido mostrada na sequência da SEQ ID NO: 2. Métodos de preparar FP6 são descritos, por exemplo, na Publicação de Patente U.S. Nº 2004/0132077, os conteúdos desta sendo incorporados neste relatório como referência. O termo “FP6”, conforme usado neste relatório, também abrange variantes desta sequência de aminoácido que diferem em substituições e/ou modificações conservadoras.

Conforme usado neste relatório, o termo “FP10” refere-se a um polipeptídeo de fusão recombinante (antígeno) derivado de *T. cruzi* tendo o domínio antigênico mostrado na Tabela 1 e a sequência de aminoácido mostrada na sequência da SEQ ID NO: 3. Métodos de preparar FP10 são descritos, por exemplo, na Publicação de Patente U.S. Nº 2004/0132077, os conteúdos desta sendo incorporados neste relatório como referência. O termo “FP10”, conforme usado neste relatório, também abrange variantes desta sequência de aminoácido que diferem em substituições e/ou modificações conservadoras.

Conforme usado neste relatório, o termo “TcF” refere-se a um polipeptídeo de fusão recombinante (antígeno) derivado de *T. cruzi* tendo o domínio antigênico mostrado na Tabela 1 e a sequência de aminoácido mostrada na sequência da SEQ ID NO: 4. Métodos de preparar TcF são descritos na Patente U.S. Nº 6.419.933, os conteúdos desta sendo incorporados neste relatório como referência. O termo “TcF”, conforme usado neste relatório, também abrange variantes desta sequência de aminoácido que diferem em substituições e/ou modificações conservadoras.

30 Tabela 1

	Domínio Antigênico	Descrição*
FP10	SAPA ^a	Antígeno de envelope de fase aguda
	MAP ^a	Proteína associada ao microtúbulo
FP6	TcR39 ^a	Citoesqueleto/proteína de membrana
	FRA ^b	Proteína repetitiva flagelar
FP3	TcR27 ^c	Proteína
	FCaBP ^d	Flagelar

TcF	PEP-2 ^b	<u>GDKPSPFOA</u> AA <u>GDKPSPFGOA</u>
	TcD ^b	<u>AEPKS</u> <u>AEPKP</u> <u>AEPKS</u>
	TcE ^b	<u>KAAIAPA</u> <u>KAAAAPA</u> <u>KAATAPA</u>
	TcLo1.2 ^b	<u>SSMP</u> S <u>GTSEEGSRGGSSMPA</u>

*Os sublinhados destacam os segmentos de repetições de aminoácido.

^a Segmentos N-terminais, repetições, e C-terminais incluídos.

^b Totalmente compreendido de repetições (PEP-2 é SEQ ID NO: 5; TcD é SEQ ID NO: 6; TcE é SEQ ID NO: 7 e TcLo1.2 é SEQ ED NO: 8)

5 ^c N-terminal e repetições incluídos.

^d Proteína de tamanho natural, não repetitiva.

Conforme usado neste relatório, os termos “paciente” e “doente” são usados permutavelmente. Conforme usado neste relatório, os termos “paciente” e “pacientes” referem-se a um mamífero, incluindo um ser humano ou um animal. Preferivelmente, o paciente é um ser humano.

Conforme usado neste relatório, o termo “amostra de teste” refere-se a uma amostra biológica derivada de soro, plasma, sangue total, saliva, fluido cérebro-espinhal, urina, ou outros fluidos corpóreos ou amostra apropriada para o teste de um paciente. A amostra de teste pode ser preparada usando técnicas de rotina conhecidas àqueles habilitados no ramo. A amostra de teste também inclui amostras de um estoque de sangue intencionado para transfusão.

Conforme usado neste relatório, o termo “variante(s)”, conforme usado em relação a um polipeptídeo (tal como, mas não limitado aos polipeptídeos de fusão recombinantes, FP3, FP6, FP10 e TcF) refere-se a um polipeptídeo que difere de uma sequência de aminoácido identificada por substituição, deleção ou a adição de cinco aminoácidos ou menos. Tais variantes geralmente podem ser identificadas modificando-se a sequência de polipeptídeo e avaliando-se as propriedades antigênicas do polipeptídeo modificado. Variantes de polipeptídeo exibem pelo menos cerca de 70 %, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90 % e o mais preferivelmente pelo menos cerca de 95 % de identidade (conforme descrito neste relatório) em relação aos polipeptídeos identificados. Conforme usado neste relatório, uma “substituição conservadora” é aquela em que um aminoácido é substituído no lugar de um outro aminoácido que tem propriedades similares, tal que aquele habilitado na técnica da química de peptídeos esperaria a estrutura secundária e a natureza hidropática do polipeptídeo a ser substancialmente não modificado. Geralmente, a mudança dentro dos grupos seguintes de aminoácidos representa mudanças conservadoras: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gin, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; e (5) phe, tyr, trp, his. Variantes também podem, ou alternativamente, conter outras modificações, incluindo a deleção ou adição de aminoácidos que têm influência mínima nas propriedades

antigénicas, estrutura secundária e/ou natureza hidropática do polipeptídeo.

Métodos de Identificar *T. cruzi* em uma Amostra

A presente invenção refere-se a métodos de identificar anticorpos para *T. cruzi* em uma amostra de teste. Os métodos envolvem obter uma amostra de teste de um paciente que é suspeito de ter sido exposto ao *T. cruzi* ou de ter sido infectado com *T. cruzi*. Uma vez que a amostra de teste necessária foi obtida, a amostra de teste é contactada com os quatro polipeptídeos recombinantes (ou antígenos), FP3, FP6, FP10 e TcF. Uma vez que a amostra de teste é contactada com os quatro polipeptídeos recombinantes, a presença ou ausência de anticorpos para cada um dos polipeptídeos depois é determinada na amostra de teste e comparada a (1) um valor de corte pré-determinado, ou (2) a intensidade do sinal gerado por um ou mais controles. Em uma modalidade alternativa, os métodos descritos neste relatório também podem ser usados para detectar infecção por *T. cruzi* em estoques de sangue. Ainda em uma outra modalidade alternativa, os métodos descritos neste relatório podem ser usados para diagnosticar infecção por *T. cruzi* em um paciente.

Existe uma variedade de formatos de ensaio diferentes que são bem conhecidos àqueles habilitados na técnica que pode ser utilizada usando os quatro polipeptídeos recombinantes FP3, FP6, FP10 e TcF neste relatório para detectar anticorpos para *T. cruzi* em uma amostra de teste. Por exemplo, em um formato de ensaio, um ou mais polipeptídeos recombinantes podem ser imobilizados em um suporte sólido para se ligarem e removerem um ou mais anticorpos da amostra de teste. O anticorpo ou anticorpos ligado(s) depois pode(m) ser detectado(s) usando uma marcação detectável que se liga ao complexo polipeptídeo/anticorpo e contém a marcação detectável. Alternativamente, um ensaio competitivo pode ser utilizado, no qual um anticorpo que se liga a um ou mais polipeptídeos recombinantes pode ser utilizado, no qual um anticorpo que se liga a um ou mais polipeptídeos é marcado com uma marcação detectável e deixado ligar ao polipeptídeo recombinante imobilizado depois da incubação com o polipeptídeo recombinante na amostra de teste. A extensão para que os componentes da amostra de teste inibam a ligação do anticorpo marcado para um ou mais polipeptídeos recombinantes é indicativo da reatividade da amostra com um ou mais polipeptídeos imobilizados.

Em termos da marcação detectável, qualquer marcação detectável conhecida na técnica pode ser usada. Por exemplo, a marcação detectável pode ser uma marcação radioativa (tal como, por exemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , e ^{33}P), uma marcação enzimática (tal como, por exemplo, horseradish peroxidase, peroxidase alcalina, glicose-6-fosfato desidrogenase, e semelhantes), uma marcação quimiluminescente (tal como, por exemplo, ésteres de acridínio, luminal, isoluminol, tioésteres, sulfonamidas, ésteres de fenantridínio, e semelhantes), uma marcação de fluorescência (tal como, por exemplo, fluoresceína (por exemplo, 5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-

hexacloro-fluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, e semelhantes)), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, pontos quânticos (por exemplo, seleneto de cádmio recoberto com sulfeto de zinco), uma marcação termométrica, ou uma marcação da reação em cadeia da imuno-polimerase. Uma introdução às marcações, procedimentos de
5 marcação e detecção de marcações é encontrada em Polak e Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2^a ed., Springer Verlag, N.Y. (1997) e em Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996), que é um guia e catálogo combinados publicado pela Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon.

O suporte sólido pode ser qualquer material conhecido àqueles de habilidade co-
10 mum na técnica para que as quatro (4) proteínas recombinantes possam ser ligadas. Exemplos de suportes sólidos que podem ser usados são um poço de teste em uma placa de microtitulação, nitrocelulose, náilon, uma pérola ou um disco (que podem ser compreendidos de vidro, fibra de vidro, látex, plástico ou um material de papel), um gel (por exemplo, um gel através do qual os polipeptídeos foram conduzidos e que é subsequentemente seco) ou
15 uma tira, disco ou folha (que podem ser compreendidos de nitrocelulose, náilon, plástico ou papel). O formato de ensaio preferido para os métodos da presente invenção é um ensaio imunoblot em um formato de fluxo passante ou teste de tira. No formato de fluxo passante ou teste de tira, o suporte sólido está na forma de uma tira, disco ou folha que é compreendida de nitrocelulose, náilon, plástico ou papel. Mais preferivelmente, os polipeptídeos re-
20 combinantes descritos neste relatório são imobilizados na dita tira, disco ou folha. Mais preferivelmente, as proteínas recombinantes são arranjadas como bandas paralelas separadas, marcas ou pontos na tira, disco ou folha (cada um dos quais pode ser referido como uma banda, marca ou ponto de "teste", coletivamente como bandas, marcas ou pontos de "teste"). As proteínas recombinantes podem ser imobilizadas na dita tira, disco ou folha usando
25 técnicas de rotina conhecidas no ramo, tais como técnicas automatizadas, tais como por jatos das proteínas recombinantes na dita tira, disco ou folha (usando um instrumento de jateamento tal como aquele disponível da Bio-Dot ((tal como o AJQ3000 Air Jet Quanti ou o RR 4200 – Dip Tank), Irvine, CA) ou técnicas manuais, tais como por pipetagem das proteínas recombinantes na dita tira, disco ou folha. Se uma folha é usada, uma vez que todas as
30 proteínas recombinantes são imobilizadas na folha, a folha pode ser cortada, usando técnicas de rotina conhecidas no ramo em tiras para o uso em um ensaio. A localização das proteínas recombinantes (e opcionalmente, quaisquer controles) na tira, disco ou folha não é crítica. Adicionalmente, a tira, disco ou folha pode ser ainda imobilizada em uma camada de suporte usando técnicas de rotina conhecidas no ramo, tais como colagem, laminação, etc.
35 A camada de suporte pode ser feita de plástico, papelão, etc. Por exemplo, uma tira ou disco de nitrocelulose pode ser laminada em uma película de plástico sensível à pressão. Ainda opcionalmente, além de qualquer região distinta utilizada para a localização de bandas

controle *in situ* ou de teste, marcas ou pontos, a tira, disco ou folha opcionalmente compreende uma região de identificação (“ID#” na Figura 1) utilizada para marcar uma amostra tal que ela possa ser diferenciada de outras amostras (por exemplo, nome, número, referência alfanumérica, código de barra, ou outros meios apropriados).

5 Os polipeptídeos recombinantes (isto é, FP3, FP6, FP10 e TcF) podem ser ligados ou imobilizados no suporte sólido usando quaisquer técnicas conhecidas àqueles habilitados no ramo (por exemplo, usando uma técnica de Western blot, o método para o qual é bem conhecido àqueles habilitados na técnica). Além disso, e opcionalmente, um ou mais controles também podem ser imobilizados no suporte sólido (tal como para o uso em um ensaio 10 imunoblot, isto é, em um formato de fluxo passante ou teste de tira). Os termos “ligado” ou “imobilizado”, conforme usados permutavelmente neste relatório, referem-se à associação não covalente, tal como adsorção, e ligação covalente (que pode ser uma ligação direta entre a proteína recombinante) e os grupos funcionais no suporte sólido ou podem ser uma 15 ligação que é efetuada por via de um agente de reticulação). A ligação por adsorção a uma tira, disco ou folha é preferida. Em tais exemplos, a adsorção pode ser obtida contatando-se soluções de cada um dos polipeptídeos recombinantes, e opcionalmente, qualquer controle em um tampão adequado, com a tira, disco ou folha durante uma quantidade de tempo adequada. O tempo de contato variará dependendo da temperatura, mas está entre cerca de 1 hora e cerca de 24 horas.

20 Se necessário, a ligação covalente dos polipeptídeos recombinantes (e opcionalmente, quaisquer controles) a um suporte sólido pode ser obtida primeiro reagindo-se o suporte sólido com um reagente bifuncional que reagirá tanto com o suporte quanto com um grupo funcional, tal como um grupo hidroxila ou amino, nos polipeptídeos recombinantes. Por exemplo, os polipeptídeos podem ser ligados a suportes tendo um revestimento de polímero apropriado usando benzoquinona ou por condensação de um grupo aldeído no suporte com uma amina e um hidrogênio ativo no polipeptídeo. 25

Uma vez que os polipeptídeos recombinantes (e opcionalmente, quaisquer controles) são imobilizados no suporte, os sítios de ligação de proteína remanescentes no suporte são tipicamente bloqueados. Qualquer agente de bloqueio adequado conhecido àqueles de 30 habilidade comum na técnica pode ser usado. Por exemplo, albumina de soro bovino (“BSA”), solução salina tamponada de fosfato (“PBS”), soluções de caseína em PBS, Tween 20® (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo), assim como outros agentes de bloqueio podem ser utilizados. Opcionalmente, para o uso de um suporte compreendendo um gel que é subsequentemente seco, o bloqueio do suporte pode não ser necessário. Depois que o bloqueio é concluído, o suporte pode opcionalmente ser lavado, tal como com PBS e deixado 35 secar (tal como por secagem ao ar) durante uma quantidade de tempo adequada. O tempo de secagem variará dependendo da temperatura, mas está entre cerca de 30 minutos e cer-

ca de 24 horas.

Os polipeptídeos imobilizados recombinantes (e opcionalmente, um ou mais contro-
les) depois são deixados incubar com a amostra de teste. Antes da dita incubação, a amo-
stra de teste pode ser diluída com um diluente adequado, tal como PBS. Durante esta incu-
5 bação, se quaisquer anticorpos estão presentes na amostra de teste, estes anticorpos se
ligarão a um ou mais polipeptídeos recombinantes no suporte sólido. Geralmente, o período
de incubação é um período de tempo que é suficiente para permitir a detecção da presença
de anticorpos para *T. cruzi* dentro da amostra de teste. Preferivelmente, o período de incu-
bação está entre cerca de 15 minutos a cerca de 6 horas. Mais preferivelmente, o período
10 de incubação está entre cerca de 1 hora e cerca de 4 horas.

A amostra de teste não ligada pode ser removida lavando-se o suporte sólido com
um tampão apropriado, tal como PBS ou um tampão Tris (tal como um tampão Tris contendo
Tris 20 mM, Tween 20[®] 0,15 % e azida sódica 0,1 %). Um ou mais reagentes detectáveis
podem ser adicionados ao suporte sólido. Reagentes detectáveis apropriados são quaisquer
15 compostos que se ligam ao complexo polipeptídeo-anticorpo imobilizado (e opcionalmente
quaisquer controles imobilizados) e que podem ser detectados por qualquer uma de uma
variedade de meios que são conhecidos àqueles habilitados na técnica. Preferivelmente, o
reagente detectável contém um agente de ligação, tal como, por exemplo, Proteína A, Prote-
ína G, uma imunoglobulina, uma lectina ou um antígeno livre) conjugado a uma marcação
20 detectável. A conjugação do agente de ligação à marcação detectável pode ser obtida u-
sando métodos padrão conhecido àqueles habilitados na técnica. Agentes de ligação co-
muns podem ser adquiridos conjugados a uma variedade de marcações detectáveis a partir
de várias fontes comerciais, incluindo, mas não limitadas a Zymed Laboratories (San Fran-
cisco, CA) e Pierce (Rockford, IL).

Um ou mais reagentes de detecção são incubados com o complexo polipeptídeo-
anticorpo imobilizado (e opcionalmente, um ou mais controles) durante uma quantidade de
tempo que é suficiente para detectar o anticorpo ou anticorpos ligados (e opcionalmente, um
ou mais controles). Um tempo de incubação adequado pode geralmente ser determinado a
partir das instruções do fabricante ou analisando-se o nível de ligação que ocorre durante
30 um período de tempo. O reagente de detecção não ligado depois pode ser removido e o
reagente de detecção ligado é detectado usando a marcação detectável. O método usado
para detectar as marcações detectáveis dependerá da natureza das marcações detectáveis
usadas no ensaio. Por exemplo, para marcações radioativas, métodos de contagem de cinti-
lação ou autorradiográficos podem ser usados. Para marcações quimiluminescentes ou fluo-
rescentes, métodos espectroscópicos podem ser usados. Marcações enzimáticas geralmen-
35 te podem ser detectadas pela adição de um substrato (usualmente durante um período de
tempo específico), seguido por análise espectroscópica ou outra análise dos produtos de

reação.

Para determinar a presença ou ausência de anticorpos para *T. cruzi* na amostra de teste, o sinal detectado a partir da marcação detectável que permanece ligado ao suporte sólido é comparado a um valor de corte pré-determinado. Mais especificamente, este valor de corte pode ser o sinal médio obtido quando as proteínas recombinantes imobilizadas são incubadas com amostras de um paciente que não está infectado com *T. cruzi*. No geral, uma amostra de teste gerando um sinal que é três desvios padrão acima da média é considerada positiva para anticorpos para *T. cruzi* e infecção por *T. cruzi*. Alternativamente, se um aparelho de leitura da luz, escuridão ou cor, tal como um densitômetro, que é capaz de gerar um valor numérico, for utilizado, o valor de corte pode ser determinado usando uma Curva Operador Receptor ("ROC"), usando o método de Sackett *et al.*, *Clinical Epidemiology. A Basic Science for Clinical Medicine*, p. 106-107 (Little Brown e Co., 1985). Resumidamente, o valor de corte pode ser determinado a partir de um lote de pares de taxas de verdadeiro positivo (isto é, sensibilidade) e taxas de falso positivo (isto é, 100 % de especificidade) que correspondem a cada valor de corte possível para o resultado de teste diagnóstico. O valor de corte no lote que é o mais próximo ao canto esquerdo superior (isto é, o valor que inclui a área maior) é o valor de corte mais exato, e uma amostra gerando um sinal que é superior ao valor de corte determinado por este método pode ser considerada positiva. Alternativamente, o valor de corte pode ser deslocado para a esquerda ao longo do lote, para minimizar a taxa de falso positivo. No geral, uma amostra gerando um sinal que é superior ao valor de corte determinado por este método é considerada positiva para infecção por *T. cruzi*. Preferivelmente, a identificação de um sinal que demonstra a ligação de anticorpos a pelo menos 2 das 4 proteínas recombinantes FP3, FP6, FP10 e TcF indica a presença de *T. cruzi* na dita amostra de teste.

Conforme previamente debatido neste relatório, o formato de ensaio preferido é um ensaio imunoblot, isto é, um formato de fluxo passante ou tira, em que quatro polipeptídeos recombinantes FP3, FP6, FP10 e TcF são imobilizados em uma tira, disco ou folha, tal como uma tira, disco ou folha de nitrocelulose, náilon, plástico ou papel, como pelo menos quatro bandas teste separadas, marcas ou pontos. A imobilização de cada um destes quatro polipeptídeos recombinantes em uma tira, disco ou folha pode ser obtida usando as técnicas previamente descritas neste relatório. Outros polipeptídeos recombinantes além destes quatro polipeptídeos (isto é, FP3, FP6, FP10 e TcF) também podem opcionalmente ser incluídos na tira, disco ou folha. Além disso, além dos quatro polipeptídeos recombinantes, a tira, disco ou folha também contém imobilizado nesta, como bandas teste separadas, marcas ou pontos, pelo menos um controle (cada um dos quais pode ser referido como uma banda "controle *in situ*", marca ou ponto, coletivamente como bandas "controle *in situ*", marcas ou pontos). É preferido que a tira, disco ou folha contenha imobilizados nesta, dois controles

distintos e separados (isto é, um primeiro controle e um segundo controle), mais preferivelmente, a tira, disco ou folha pode conter imobilizados nesta, três controles distintos e separados (isto é, um primeiro controle, um segundo controle e um terceiro controle). Se mais do que um controle está presente, então os controles podem ser idênticos entre si ou diferentes entre si. Preferivelmente, pelo menos dois controles são idênticos (tais como, por exemplo, o primeiro controle e o segundo controle). Se dois controles são idênticos, é preferido que a concentração de um dos controles (tanto o primeiro controle quanto o segundo controle ou se os três controles estão presentes, o primeiro controle ou o terceiro controle ou o segundo controle ou terceiro controle) imobilizada na tira, disco ou folha seja mais alta (ou maior) do que o outro controle imobilizado na tira, disco ou folha. O controle imobilizado na tira, disco ou folha em uma concentração mais alta do que o outro controle é referido como o “controle alto”. O controle imobilizado na tira, disco ou folha em uma concentração mais baixa do que o controle alto é referido como o “controle baixo”. A razão da concentração do controle baixo para o controle alto presentes na tira, disco ou folha pode ser de cerca de 1:2 a cerca de 1:10, preferivelmente, cerca de 1:5 a cerca de 1:6. Por exemplo, o primeiro controle pode ser o controle baixo e o segundo controle pode ser o controle alto. Alternativamente, o primeiro controle pode ser o controle alto e o segundo controle pode ser o controle baixo. Por via de um outro exemplo, a tira, disco ou folha pode conter 3 controles, isto é, um controle baixo e um controle alto e igualmente um terceiro controle (que pode ser usado, por exemplo, para verificar a adição de amostra). O controle baixo e o controle alto podem ser IgG humana (em que a razão do controle baixo para controle alto é de cerca de 1:2 a cerca de 1:10) e o terceiro controle pode ser uma IgG anti-humana de cabra.

No formato de fluxo passante, uma extremidade da tira, disco ou folha na qual os polipeptídeos recombinantes são ligados pode ser imersa em uma solução contendo a amostra de teste. Alternativamente, a tira, disco ou folha completa pode ser colocada em uma bandeja de reação junto com um diluente, e depois a amostra de teste adicionada à bandeja de reação. A amostra de teste e a tira são deixadas incubar durante um período de tempo suficiente usando os mesmos tempos e técnicas previamente descritos neste relatório. A amostra de teste não ligada pode ser removida usando as técnicas previamente descritas neste relatório. Neste formato, anticorpos dentro da amostra de teste se ligam aos polipeptídeos imobilizados (e a pelo menos um controle) conforme a amostra de teste passa através da membrana. Pelo menos um reagente de detecção (tal como um reagente de detecção previamente descrito neste relatório contendo uma marcação detectável) pode ser adicionado. Pelo menos um reagente de detecção se liga a cada um dos polipeptídeos e complexos polipeptídeo-anticorpo formados como a solução contendo os fluxos de reagente de detecção através da tira. Para determinar a presença ou ausência de anticorpos para *T. cruzi* na amostra de teste, a detecção dos reagentes de detecção ligados pode ser realizada confor-

me descrito acima usando um corte ou comparando-se a intensidade de um ou mais sinais gerados por um ou mais controles, conforme debatido em mais detalhe abaixo.

Quando um controle baixo e um controle alto, conforme descritos acima, são usados no formato de fluxo passante, é preferido que a presença ou ausência dos anticorpos para *T. cruzi* na amostra de teste seja determinada identificando-se a presença de um sinal a partir da marcação detectável em cada uma das bandas teste (ou marcas ou pontos) para os polipeptídeos. Se um sinal é identificado em uma banda teste para um polipeptídeo, então a intensidade deste sinal detectado é comparada com a intensidade do sinal a partir da banda controle baixo (ou marca ou ponto) e da banda controle alto (ou marca ou ponto), usando uma escala de 0 a 4+. A leitura é 0 quando nenhuma banda é visível. As intensidades da banda controle baixo e da banda controle alto são definidas como 1+ (para o controle baixo) e 3+ (para o controle alto), respectivamente. Uma banda teste com uma intensidade comparável àquela do controle baixo seria estabelecida 1+. Uma banda com intensidade entre aquela do controle baixo e a banda controle alto seria estabelecida 2+. Uma banda com uma intensidade comparável àquela do controle alto seria estabelecida 3+. Uma intensidade da banda maior do que aquela do controle alto seria estabelecida 4+. Uma banda fraca com intensidade mais fraca do que aquela do controle baixo seria estabelecida +/- (Veja Tabela 2). Conforme mostrado no algoritmo exemplar representado na Figura 3, se os resultados do ensaio imunoblot são (1) bandas não visíveis (exceto as bandas para o controle baixo, controle alto e controle negativo); ou (2) apenas uma banda única é visível (exceto as bandas para o controle baixo, controle alto e controle negativo), então a amostra de teste é considerada negativa para *T. cruzi*. Conforme também mostrado no algoritmo exemplar representado na Figura 3, se os resultados do ensaio imunoblot são que duas ou mais bandas para os polipeptídeos recombinantes demonstram um sinal, então a análise seguinte deve ser realizada. Especificamente, se todas as bandas exibem uma intensidade que é mais fraca do que o controle baixo, isto é, todas as bandas são estabelecidas +/-, então a amostra de teste é considerada indeterminada para *T. cruzi*. Entretanto, se pelo menos uma das bandas é estabelecida 1+ ou mais, então a amostra de teste é considerada positiva em relação a anticorpos para *T. cruzi*.

Tabela 2

<u>Intensidade</u>	<u>Escore</u>
Ausente	0
Fraco ou < hlgG-L CTL <i>in situ</i>	+/-
^w hlgG-L CTL <i>in situ</i>	1+
Entre hlgG-L CTL <i>in situ</i> e hlgG-H CTL	2+
= hlgG-H CTL <i>in situ</i>	3+
> hlgG-H CTL <i>in situ</i>	4+

Os ensaios descritos acima podem ser realizados usando mais do que os quatro polipeptídeos recombinantes descritos neste relatório. Exemplos de outros polipeptídeos de *T. cruzi* recombinantes que podem ser usados, incluem, mas não são limitados a, JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TCP2 β _N-C29 e SA85-1.1. As sequências de aminoácido e métodos para fabricar cada um destes polipeptídeos recombinantes são bem conhecidos àqueles habilitados na técnica. Por exemplo, as sequências de aminoácido para PEP-2, TcD e TcE são divulgadas na Patente U.S. Nº 6.054.135. Os polipeptídeos JL8, TCR27, TCR39, Ag36, JL9, TCNA e FCaBP são debatidos em Frasc, A.C.C. *et al.*, "Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens". *Parasitol. Today* 7:148-151 (1991). O polipeptídeo Tc-28 é debatido em Abate, T. *et al.*, "Cloning and partial characterization of a 28kDa antigenic protein of *Trypanosoma cruzi*." *Biol Res.*, 26:121-130 (1993). O nucleotídeo e a sequência de aminoácido deduzida de cDNA de Tc-40 são descritos em Lesenechal, M. *et al.*, "Cloning and characterisation of a gene encoding a novel antigen of *Trypanosoma cruzi*". *Mol. Biochem. Parasitol.*, 87:193-204 (1997). Os polipeptídeos FL-160 e SA85-1.1 são debatidos em Centron, M.S. *et al.* "Evaluation of recombinant tripomastigote surface antigens of *Trypanosoma cruzi* in screening sera from a population in rural Northeastern Brazil endemic for Chagas disease". *Acta Trop.*, 50:259-266 (1992). O polipeptídeo CEA é debatido em Jazin, E.E. *et al.* "*Trypanosoma cruzi* exoantigen is a member of a 160 kDa gene family." *Parasitol.*, 110:61-69 (1995). A sequência de aminoácido para CRP (identificado como CRP-10) é descrita em Norris, K.A. *et al.*, "Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein." *Infect Immun* 65:349-357 (1997). O polipeptídeo JL7 é debatido em Umezawa, ES, *et al.*, *J Clinical Microbiology*, 37:1554-1560 (1999) e Cotrim, PC, *et al.*, *J. Clinical Microbiology*, 28:519-524 (1990). O polipeptídeo TcLo1.2 é debatido em Houghton, RL, *et al.*, *J. Infectious Diseases*, 179:1226-1234 (1999). O polipeptídeo Tcp2 β _N-C29 é descrito em Aguirre, S., *et al.*, *J. Clin. Microbiology*, 44(10):3768-3774 (Outubro de 2006).

Adicionalmente, o imunoenensaio pode ser revisado para incluir ainda antígenos polipeptídicos para a detecção de outras doenças, distúrbios ou condições, especialmente para a detecção de outras doenças parasíticas. Junto com os parasitas que causam a doença de Chagas (tripanossomíase Americana), os parasitas que causam a doença do sono Africana (tripanossomíase Africana) e a leishmaniose causam doenças humanas mortais que afetam meio bilhão de pessoas mais pobres do mundo. Assim, opcionalmente, um imunoblot de acordo com a invenção compreende ainda polipeptídeos para a detecção de outras doenças parasíticas tais como doença do sono Africana e/ou leishmaniose.

Por via de exemplo, e não de limitação, os exemplos da presente invenção serão agora fornecidos.

EXEMPLO 1: Formato de ensaio imunoblot

Preparação de imunotira. Soluções de concentração alta de IgG humana ("IgG-H"), concentração baixa de IgG humana ("IgG-L"), IgG anti-humana de cabra (as 3 bandas controle *in situ*), assim como os antígenos recombinantes ("rAgs") FP10, FP6, FP3, e TcF (as 4
5 bandas teste) foram preparadas. Especificamente, cada proteína foi dissolvida em um pH 7, tampão 3-(N-morfolinol-2-hidroxipropanossulfonato de sódio 20 mM. Usando um sistema de dispensação XYZ3050 controlado por microprocessador da Bio-Dot (Irvine, CA) 1 microlitro por cm de cada proteína foi jateado em folhas de membrana de nitrocelulose (0,45 microns, 5 x 30 cm; Whatman Schleicher & Schell, Keene, NH) em linhas paralelas nas posições re-
10 lacionadas representadas na Figura 1. As concentrações das soluções de jateamento foram como segue: TcF a 75 microgramas/ml; FPP3 a 0,4 microgramas/ml; FP6 a 0,7 microgramas/ml; FP10 a 6 microgramas/ml; IgG anti-humana de cabra a 25 microgromas/ml; IgG-L a 2,5 microgromas/ml e 15 microgramas para IgG-H. Depois da secagem (37 °C, 30 minutos), a membrana foi bloqueada com 1 % de caseína em solução salina tamponada de fosfato
15 ("PBS"), lavada várias vezes em PBS, e novamente seca ao ar. Como uma etapa final, a folha de membrana foi laminada com uma película de plástico sensível à pressão e cortada em tiras amplas de 4 mm. A carga das proteínas foi ajustada de modo que o espécime controle negativo (Figura 2, tira 1) não mostrou quaisquer bandas teste (exceto as bandas controle - IgG anti-humana de cabra, IgG-L e IgG-H) e o espécime controle positivo (Figura 2, tira 2) mostrou 4 bandas teste, enquanto em ambos os casos as 3 bandas controle foram reativas. Um painel de amostras reativas (Figura 2, tiras 3 a 6) mostrou 1 a 4 bandas teste, além das 3 bandas controle.

Espécimes controle. O controle negativo foi plasma humano normal recalcificado que testou negativo em ensaios para o antígeno de superfície de hepatite B ("HBsAg") e foi
25 anticorpos para a proteína do núcleo do vírus da hepatite B ("HBcore"), vírus da hepatite C ("HCV"), vírus da imunodeficiência humana ("HIV") e vírus linfotrófico de células T humanas ("HTLV"). O controle positivo de anticorpo para *T. cruzi* foi de um pool de várias unidades de plasma retiradas de doadores de sangue diagnosticados com doença de Chagas. O plasma positivo foi confirmado positivo por vários testes de anticorpo para *T. cruzi*, incluindo ELISA-I
30 (um teste com base em lisato comercialmente disponível na América Latina), ELISA-II (um teste validado de 510(k) com base em antígenos recombinantes), e RIPA.

Procedimento de teste. Espécimes controle positivo e negativo foram incluídos em cada operação. Amostras de soro ou plasma previamente congeladas foram microcentrifugadas (14.000 rpm, 5 minutos) em tubos Eppendorf de 1,5 ml antes do teste para remover
35 matéria particulada; amostras que nunca tinham sido congeladas não foram centrifugadas. 1 ml de diluente e uma imunotira foram colocados em cada cuba de uma bandeja de reação imunoblot (Bio-Rad, Hercules, CA) e incubados durante 5 min. Durante cada etapa de incu-

bação, os teores das cubas foram suavemente misturados em um agitador. Uma amostra de 20 μ l foi adicionada a cada cuba contendo uma tira no diluente e incubada na temperatura ambiente durante 2 horas, seguido por aspiração e três lavagens com um tampão Tris (pH 8,0, Tris 20 mM, Tween-20 0,15 %, e azida sódica 0,1 %). Um ml de uma solução de anti-hIgG de cabra conjugada com fosfatase alcalina foi adicionado a cada cuba. Depois de uma hora de incubação, cada cuba foi aspirada e lavada três vezes. Em seguida, 0,7 ml de uma solução de substrato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitro azul de tetrazólio ("BCIP/NBT"; 1 tablete em 20 ml de água destilada; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi adicionado a cada poço e incubado na temperatura ambiente durante 10 minutos para desenvolvimento de cor. Isto foi seguido por aspiração e três lavagens com água destilada para interromper o desenvolvimento de cor. Subsequentemente, as tiras foram removidas das cubas e secas ao ar para leitura visual. O tempo de ensaio total foi de cerca de 4 horas.

Interpretação dos resultados do teste. A reatividade do anticorpo para *T. cruzi* em um espécime de teste é determinada por comparação visual das intensidades das 4 bandas teste com a intensidades das duas bandas controle IgG no topo da tira, usando uma escala de 0 a 4+. A leitura é 0 quando nenhuma banda é visível, e as intensidades das bandas controle IgG-L e IgG-H são definidas como 1+ e 3+ respectivamente. Com estes marcos em mente, uma banda teste com intensidade comparável àquela do controle IgG-L humana seria estabelecida 1+; uma banda com intensidade entre aquela do controle IgG-L e aquela do controle IgG-H seria estabelecida 2+; uma banda com intensidade comparável àquela do controle IgG-H seria estabelecida 3+; e uma intensidade da banda maior do que aquela do controle IgG-H seria estabelecida 4+. Finalmente, uma banda fraca com intensidade mais fraca do que aquela do controle IgG-L seria estabelecida +/-.

Outros ensaios sorológicos. O ensaio de Chagas Abbott PRISM[®] (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) foi realizado conforme previamente descrito em Chang, C.D., *et al.*, *Transfusion* 46:1737-1744 (2006). O RIPA foi realizado conforme previamente esboçado (Veja, Kirchoff, L.V., *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 155:561-564 (1987) e Kirchoff, L.V., *et al.*, *Transfusion*, 46:298-304 (2006)), e todo o teste RIPA foi feito às cegas.

Espécimes chagássicos. Um total de 345 espécimes de soro ou plasma humano positivo de anticorpo para *T. cruzi* foi obtido da American Red Cross, Antibody Systems (Hurst, TX), BioClinical Partners (Franklin, MA), Biocollections Worldwide, Inc. (Miami, FL), Boston Biomedica, Inc. (BBI, West Bridgewater, MA), Goldfinch Diagnostics Inc. (Iowa City, IA), Teragenix Corp. (Ft. Lauderdale, FL), e da Universidade Federal da Bahia (Salvador, Bahia, Brasil). Estes espécimes originaram-se de pessoas que adquiriram *T. cruzi* na maioria dos países das Américas Central e do Sul, assim como no México e nos Estados Unidos (Veja, Tabela 3 abaixo). Todas estas pessoas foram positivas em 2 ou 3 imunoenaios para *T. cruzi* convencionais (IHA, IFA, e ELISA) e também no RIPA.

Tabela 3

<u>País de Origem</u>	<u># de Amostras</u>
Argentina	40
Bolívia	53
Brasil	126
Chile	5
Colômbia	1
Equador	1
El Salvador	12
Honduras	1
México	17
Nicarágua	16
Suriname	1
EUA	4
Venezuela	21
Desconhecido	44

População doadora aleatória. Um total de 500 espécimes de doadores aleatoriamente selecionados (soros (150) e plasma EDTA (350)), foi obtido da Gulf Coast Regional Blood Center (Houston, TX). Estes espécimes desassociados foram coletados de doadores aleatórios e nenhum espécime foi eliminado deste grupo devido a resultados positivos em qualquer um dos seis testes de rotina feitos em unidades doadas. Todos os espécimes foram testados durante 10 dias da coleta tanto no ensaio imunoblot quanto no ensaio de Chagas Abbott PRISM®. Todas as amostras reativas com valores S/CO de 0,90 ou mais no ensaio de Chagas Abbott PRISM® foram testadas em ELISA-I, ELISA-II, e RIPA.

Espécimes potencialmente problemáticos. Um total de 271 espécimes de soros ou plasma armazenados, sorologicamente positivos para outras doenças ou contendo substâncias potencialmente interferentes, foi conduzido no ensaio imunoblot. Este grupo incluiu espécimes de pessoas com citomegalovírus ("CMV") (n = 4), Vírus Epstein-Barr ("EBV") (n = 14), vírus da hepatite A ("HAV") (n = 10), helmintos ou protozoários intestinais (n = 5), HIV (n = 10), vírus do herpes simples ("HSV") (n = 15), hanseníase (n = 15), rubéola (n = 10), sífilis (n = 10), toxoplasmose (n = 5), tuberculose (n = 3), levedura (n = 10), vírus da varicela-zoster ("VZV") (n = 10), hemólise (n = 20), hiper-IgG (n = 10), hiper-IgM (n = 10), hiperbilirrubinemia (n = 10), hipertrigliceridemia (n = 15), influenza vacinado (n = 15), mieloma múltiplo (n = 15), esclerose múltipla (n = 5), fator reumatóide (n = 15), anticorpos anti-camundongo humanos (n = 15), lúpus eritematoso sistêmico (n = 11), e leishmaniose (n = 9). Estes foram adquiridos de vários fornecedores incluindo New York Biologicals (New York, NY), Pro-

MedDx (Norton, MA), SeraCare Life Sciences, Inc (West Bridgewater, MA), e Hemacare Bioscience (Ft. Lauderdale, FL). Estas 271 amostras foram testadas no ensaio imunoblot da presente invenção e no protótipo do ensaio de Chagas Abbott PRISM®. Todos os espécimes que foram repetidamente reativos posteriormente foram testados no ELISA-I, ELISA-II, e depois confirmados ainda com RIPA.

Resultados. Os resultados obtidos com o ensaio imunoblot da presente invenção são mostrados na Figura 1, onde as localizações das três bandas controle *in situ* e as quatro bandas teste rAg (FP10, FP6, FP3 e TcF) são claramente evidentes. Todos os 345 espécimes positivos de anticorpo para *T. cruzi* mostraram duas ou mais bandas teste no ensaio imunoblot. Um total de 277 destes espécimes mostrou quatro bandas teste, 60 mostrou três bandas, 8 mostrou duas bandas, e em destaque, nenhum mostrou uma banda única ou foi totalmente negativo. A maioria das bandas teste com as amostras positivas mostrou intensidade igual ou maior do que a banda controle IgG-L (1+). Além disso, todos os 345 espécimes foram reativos no ensaio de Chagas Abbott PRISM® e no ELISA-II. Ao contrário, seis dos 272 espécimes neste grupo de 345 que foram testados no ELISA-I foram negativos, embora todos os seis apresentassem valores S/CO acima da referência, variando de 0,60 a 0,89 (Veja, Tabela 4, abaixo). Estas amostras discordantes foram confirmadas como fraco positivos em RIPA e mostraram duas ou três bandas teste no ensaio imunoblot, com pelo menos uma intensidade da banda de 1+ ou mais. Devido ao nível de detecção mais baixo de ELISA-I observado no teste dos 272 primeiros espécimes positivos, este foi eliminado em relação a comparações de sensibilidade adicionais com outros ensaios em amostras chagásicas recentemente adquiridas, embora tenha sido usado para verificação cruzada de amostras repetidamente reativas do ensaio de Chagas Abbott PRISM®.

Tabela 4

Amostra ID	Ensaio de Chagas ABBOTT S/CQ	ELISA-I (Lisato) S/CQ	ELISA-II (rAg) S/CQ	RIPA	Imunoblot	
					Bandas teste presentes	Interpretação
Rag-40218	4,40	0,66	2,62	+ (fraco)	Duas	Positivo
Rag-40224	3,86	0,77	3,56	+ (fraco)	Três	Positivo
RR04	1,52	0,83	3,02	+ (fraco)	Três	Positivo
RR52	2,07	0,83	3,56	+	Três	Positivo
RR115	1,50	0,60	3,53	+ (fraco)	Duas	Positivo
RR334	2,37	0,89	3,53	+ (fraco)	Duas	Positivo

Os 500 espécimes de doadores aleatórios foram testados no ensaio imunoblot da presente invenção e também no protótipo do ensaio de Chagas Abbott PRISM®. No imuno-

ensaio da presente invenção, um espécime forneceu uma banda teste 1+ única e dois outros mostraram uma banda teste (+/-) fraca. Nenhuma destas amostras foi reativa no ensaio de Chagas Abbott PRISM[®] nem nos dois ELISAs; conseqüentemente, estas amostras não foram enviadas para RIPA. Tendo em vista os resultados negativos obtidos com estes três espécimes nos três ensaios de comparação, a reatividade limitada observada no ensaio imunoblot da presente invenção parece ser não específica.

Dos 271 espécimes com vários estados da doença ou substâncias potencialmente interferentes testados no ensaio imunoblot da presente invenção, 265 não mostraram bandas teste, quatro forneceram uma banda 1+ única, e dois mostraram três bandas teste. Os quatro espécimes com uma banda teste única foram não reativos no ensaio de Chagas Abbott PRISM[®]. Entretanto, ambos os espécimes mostrando três bandas teste também foram reativos no ensaio de Chagas Abbott PRISM[®], ELISA-I, e ELISA-II, e foram confirmados como positivos no RIPA (Veja Tabela 5, abaixo). Adicionalmente, conforme mostrado na Tabela 5 abaixo, três espécimes que forneceram valores S/CO acima de 0,90 no ensaio de Chagas Abbott PRISM[®] não foram confirmados por RIPA e não mostraram bandas teste no ensaio imunoblot.

Tabela 5

Amostra ID	Ensaio de Chagas Abbott PRISM [®] S/CQ	ELISA-I (Lisato) S/CQ	ELISA-II (rAg) S/CQ	RIPA	Imunoblot	
					Bandas teste presentes	Interpretação
Protozoário ^a , 2e03	9,55	3,02	2,82	Positivo	Três	Positivo
Hanseníase ^b , 3b10	9,96	2,36	2,92	Positivo	Três	Positivo
HAMA ^c , #1	11,92	0,32	1,10	Negativo	Nenhuma	Negativo
HSV-1, #2	0,92	0,65	0,15	Negativo	Nenhuma	Negativo
HSV-2, #4	4,01	0,65	0,26	Negativo	Nenhuma	Negativo

^a Doador brasileiro, testado positivo para protozoário intestinal

^b Doador brasileiro

^c Anticorpos anti-camundongo humanos ("HAMA")

Com base nos resultados obtidos testando-se estes três grupos de espécimes, que totalizam 1.116, o esquema seguinte pode ser usado para interpretar os padrões das bandas teste que aparecem nas imunotiras: a) nenhuma banda ou uma banda única – negativo; b) duas ou mais bandas com pelo menos uma banda tendo intensidade de 1+ ou mais – positivo; e c) bandas fracas múltiplas (+/-) – indeterminado (Veja, Figura 3).

Quando este esquema é aplicado aos padrões das bandas teste obtidas com os 345 espécimes positivos de anticorpo para *T. cruzi*, todos são considerados positivos, assim fornecendo uma sensibilidade de 100 % (345/345). Com os 500 espécimes doadores aleatórios, 497 não mostraram bandas teste, dois mostraram uma banda 1+ única, e 1 mostrou uma banda fraca (+/-); assim todos são negativos e a especificidade resolvida é de 100 % (500/500). Finalmente, usando este esquema, o ensaio imunoblot da presente invenção mostrou uma especificidade resolvida de 100 % (269/269) nos 271 espécimes com estados da doença ou substâncias interferentes.

Durante o desenvolvimento do ensaio de Chagas Abbott PRISM® e do ensaio imunoblot, aproximadamente 42.000 espécimes de soros e plasma desassociados de doadores aleatórios dos Estados Unidos foram testados e foi descoberto que 21 que foram repetidamente reativos na zona cinza no ensaio de Chagas Abbott PRISM®. Seis espécimes no último grupo foram reativos em ELISA-I e ELISA-II, e foram confirmados como positivos por RIPA (Veja Tabela 6, abaixo). Cinco destes seis espécimes mostraram três ou quatro bandas teste no ensaio imunoblot e assim foram interpretados como positivos. O sexto espécime neste grupo, #5060, não pode ser testado no ensaio imunoblot, pois ele foi esgotado antes que o desenvolvimento do último tenha sido iniciado.

Tabela 6

Amostra ID	Ensaio de Chagas Abbott PRISM® S/CQ	ELISA-I (Lisato) S/CQ	ELISA-II (rAg) S/CQ	RIPA	Imunoblot	
					Bandas teste presentes	Interpretação
#437	10,9	3,58	2,31	+	Quatro	Positivo
#5060	6,78	2,64	7,27	+	NT*	NA
#161	7,85	2,89	8,10	+	Quatro	Positivo
#S2712	2,90	1,46	5,00	+ (fraco)	Três	Positivo
#S108677	1,58	1,13	2,74	+	Três	Positivo
#P91	7,92	2,53	3,20	+	Quatro	Positivo

*NT= não testado devido ao volume insuficiente

Os quinze espécimes reativos no ensaio de Chagas Abbott PRISM® remanescentes, a maioria dos quais tem S/COs relativamente baixos, foram todos negativos por RIPA (Veja Tabela 7, abaixo). Todos foram negativos em ELISA-I, porém dois foram reativos e dois se apresentaram na zona cinza em ELISA-II. No ensaio imunoblot, oito destes 15 espécimes não mostraram bandas teste e os outros sete mostraram uma banda única, incluindo #1660 que mostrou uma banda FP3 única como a Tira 3 na Figura 2. Assim, todos os quinze foram resolvidos como negativos quando o esquema de interpretação descrito acima foi

aplicado.

Tabela 7

Amostra ID	Ensaio de Chagas Abbott PRISM® S/CQ	ELISA-I (Lisato) S/CQ	ELISA-II (rAg) S/CQ	RIPA	Imunoblot	
					Bandas teste presentes	Interpretação
#P1497	2,92	0,26	2,23	Neg	Nenhuma	Negativo
#P1660	2,64	0,42	2,75	Neg	Banda (2+) de FP3 única	Negativo
#P1705	1,50	0,45	0,13	Neg	Nenhuma	Negativo
#P1788	1,05	0,37	0,13	Neg	Banda (+/-) fraca de TcF única	Negativo
#P2171	1,66	0,47	0,14	Neg	Nenhuma	Negativo
#P3881	1,61	0,23	0,12	Neg	Banda (+/-) fraca de TcF única	Negativo
#P6257	2,13	0,47	0,14	Neg	Nenhuma	Negativo
#P6817	2,65	0,88	0,58	Neg	Banda (+/-) fraca de FP10 única	Negativo
#P7087	1,00	0,29	0,14	Neg	Banda (+/-) fraca de FP6 única	Negativo
#P7957	2,25	0,56	0,90	Neg	Nenhuma	Negativo
#P8956	0,90	0,77	0,18	Neg	Banda (+/-) fraca de TcF única	Negativo
#P9026	1,12	0,42	0,16	Neg	Nenhuma	Negativo
#P9228	1,81	0,24	0,17	Neg	Nenhuma	Negativo
#P9807	1,00	0,38	0,34	Neg	Banda de FP6 única	Negativo
#S108760	1,83	0,64	0,95	Neg	Nenhuma	Negativo

O ensaio de Chagas imunoblot da presente invenção fornece 14 domínios antigênicos distintos, incluindo segmentos repetitivos, assim como não repetitivos, em apenas qua-

tro bandas teste (Veja Tabela 1). Este arranjo mantém o potencial para reduzir marcadamente o risco de reação falso negativo, enquanto ao mesmo tempo considera o esquema de interpretação simples apresentado na Figura 3. Este esquema de interpretação foi desenvolvido analisando-se os resultados obtidos conduzindo-se o ensaio imunoblot da presente invenção nos três grupos de espécimes positivos e negativos descritos acima. Os resultados indicam claramente que a reatividade em duas bandas teste é necessária para uma interpretação positiva. A adoção de um esquema de interpretação em que duas bandas teste reativas são necessárias para a confirmação de anticorpos anti-*T. cruzi* está de acordo com a interpretação dos western blots usados para confirmar HIV (Veja, Maldarelli, F., "Diagnosis of human immunodeficiency virus infection", p. 1506-1527. Em G. L. Mandell, J.E. Bennett, e R. Dolin (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. John Wiley & Sons, New York) e Lyme borreliosis (Veja, Aguero-Rosenfeld, M.E., *Clin Microbiol., Rev.*, 18:484-509 (2005)) e com o ensaio imunoblot recombinante para anticorpos para HCV (Veja, Tobler, L.H., *Transfusion*, 40:917-923 (2000)), todos os três dos quais exigem mais do que uma banda teste reativa para identificação positiva de uma infecção específica.

Além disso, com respeito ao ensaio imunoblot da presente invenção, conforme indicado, no grupo de 345 espécimes conhecido ser positivo em relação a anticorpos para *T. cruzi*, a sensibilidade do ensaio foi de 100 %. Este resultado foi particularmente interessante, dada a diversidade geográfica dos espécimes (Veja Tabela 3 acima) e o fato de que não há pré-seleção para titulações altas. Todos os espécimes neste grupo foram reativos no ensaio de Chagas Abbott PRISM® e no ELISA-II recombinante, porém seis dos 272 espécimes testados no ELISA-I com base em lisato foram negativos. Todos os seis foram fracamente positivos no RIPA, e estes resultados sugerem que uma faixa ampla de reatividade com antígenos de *T. cruzi* esteve presente no grupo de 345 positivos e que o ensaio imunoblot é capaz de detectar positivos de titulação baixa.

Nos dois grupos de espécimes presumidamente negativos de anticorpo para *T. cruzi*, a especificidade do ensaio imunoblot da presente invenção foi de 100 % quando o esquema interpretativo descrito acima e mostrado na Figura 3 foi usado. Os 500 espécimes doadores aleatórios do Texas, todos os quais foram negativos no ensaio imunoblot, também foram negativos no ensaio de Chagas Abbott PRISM® e nos dois ELISAs e assim, não foram testados no RIPA. Nos 271 espécimes de reação potencialmente cruzada testados, dois espécimes brasileiros, de doentes com hanseníase e uma infecção por protozoário intestinal, foram positivos no ensaio imunoblot (três bandas teste) e também foram claramente positivos nos outros ensaios, incluindo RIPA, assim sugerindo que estes são verdadeiro positivos (Veja, Tabela 5, acima). Os três espécimes dos Estados Unidos foram reativos no ensaio de Chagas Abbott PRISM® e um foi reativo por ELISA-II; entretanto, todos foram negativos no ELISA-I e RIPA. Com importância, nenhum destes espécimes mostrou quaisquer

bandas teste no ensaio imunoblot da presente invenção, assim sugerindo que o último é uma ferramenta útil para resolver espécimes que são discordantes em outros ensaios. Geralmente, a especificidade resolvida do ensaio imunoblot neste grupo desafiador de espécimes foi de 100 % (269/269).

5 O estudo de um grupo final de espécimes também demonstra a utilidade do ensaio imunoblot da presente invenção como um teste confirmatório. Conforme explicado acima, em estudos de aproximadamente 42.000 doadores aleatórios dos Estados Unidos desassociados, 21 espécimes foram reativos no ensaio de Chagas Abbott PRISM® ou no ensaio imunoblot. Seis das amostras foram globalmente positivas, e as cinco para que três apre-
10 sentem volume suficiente remanescente foram claramente positivas no ensaio imunoblot, o qual mostra três ou quatro bandas teste (Veja Tabela 6, acima). Com respeito aos resultados obtidos com os outros 15 espécimes no ensaio de Chagas Abbott PRISM® (Veja Tabela 7, acima), todos estes espécimes apresentaram S/COs relativamente baixos no ensaio de Chagas Abbott PRISM® e foram algumas vezes reativos, porém basicamente negativos no
15 ELISA-I. Quatro dos 15 espécimes foram reativos no ELISA-II Com importância, todos os 15 espécimes foram negativos no RIPA, e novamente deve-se mencionar que todo o teste RIPA foi feito às cegas. Finalmente, todos os 15 espécimes também foram negativos no ensaio imunoblot. Como é evidente na Tabela 7, cerca da metade dos espécimes mostrou alguma reatividade, porém nenhuma foi positiva quando o esquema de interpretação descri-
20 to acima e mostrado na Figura 3 foi usado. Levando em consideração que estes 15 espécimes são na maioria das vezes desafiadores no grupo total de 42.000 testados, foi inesperado que foram todos resolvidos pelo ensaio imunoblot da presente invenção, de uma maneira que foi 100 % concordante com os resultados do RIPA. Em conclusão, estas descobertas e aquelas geradas testando-se outros grupos de espécimes estudados neste exemplo indicam
25 que o ensaio imunoblot da presente invenção pode fornecer um teste exato para a confirmação sorológica de infecção por *T. cruzi* crônica.

Uma pessoa habilitada na técnica avaliaria prontamente que a presente invenção está bem adaptada para executar os objetivos e obter as finalidades e vantagens mencionadas, assim como aquelas inerentes nesta. Os complexos moleculares e os métodos, proce-
30 dimentos, tratamentos, moléculas, compostos específicos descritos neste relatório são presentemente representativos de modalidades preferidas, são exemplares, e não são intencionados como limitações no escopo da invenção. Será prontamente evidente a uma pessoa habilitada na técnica que substituições e modificações variadas podem ser feitas na invenção divulgada neste relatório sem divergir do escopo e do espírito da invenção.

35 Todas as patentes e publicações mencionadas no relatório descritivo são indicativos dos níveis daqueles habilitados na técnica a que a invenção pertence. Todas as patentes e publicações são, neste relatório, incorporadas como referência sob a mesma extensão

como se cada publicação individual fosse específica e individualmente indicada para ser incorporada como referência.

A invenção ilustrativamente descrita neste relatório pode ser adequadamente praticada na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações que não é especificamente divulgado neste relatório. Assim, por exemplo, em cada exemplo neste relatório, qualquer um dos termos "compreendendo," "consistindo essencialmente de e "que consiste de" pode ser substituído por qualquer um dos outros dois termos. Os termos e expressões que foram utilizados são usados como termos de descrição e não de limitação, e não há intenção quanto ao uso de tais termos e expressões de excluir quaisquer equivalentes das características mostradas e descritas ou porções destes, porém é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Assim, deve ser entendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente divulgada por modalidades preferidas e características opcionais, modificações e variações dos conceitos divulgados neste relatório podem ser feitas por aqueles habilitados na técnica, e que tais modificações e variações são consideradas dentro do escopo desta invenção, conforme definido pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de identificar *Trypanosoma cruzi* em uma amostra de teste, o método sendo **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

5 contatar uma amostra de teste de um ser humano com os quatro polipeptídeos re-combinantes FP3, FP6, FP10 e TcF; e

 detectar a ligação de anticorpos presentes na dita amostra de teste a pelo menos dois dos ditos polipeptídeos recombinantes, a presença da dita ligação dos ditos anticorpos a pelo menos dois dos ditos polipeptídeos recombinantes indicando a presença de *Trypano-*
10 *soma cruzi* na dita amostra de teste.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a amostra de teste é selecionada do grupo que consiste de sangue, soro, plasma, saliva, fluido cérebro-espinhal e urina.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda a etapa de contatar a amostra de teste com pelo menos um polipeptídeo recombinante adicional selecionado do grupo que consiste de JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 e SA85-1.1.

4. Fase sólida tendo imobilizados nesta os quatro polipeptídeos recombinantes FP3, FP6, FP10 e TcF, e um primeiro controle e um segundo controle, **CARACTERIZADA**
20 pelo fato de que o primeiro controle ou o segundo controle é imobilizado na fase sólida em uma concentração que é menor do que o outro controle.

5. Fase sólida, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que tem ainda imobilizado nesta pelo menos um polipeptídeo recombinante adicional selecionado do grupo que consiste de JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, T-
25 cLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 e SA85-1.1.

6. Fase sólida, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita fase sólida é selecionada do grupo que consiste de nitrocelulose, náilon, plástico e papel.

7. Fase sólida, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de
30 que a dita fase sólida é uma tira tendo os ditos polipeptídeos imobilizados nesta.

8. Fase sólida, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que os ditos polipeptídeos são arranjados como bandas separadas na dita fase sólida.

9. Método de diagnosticar *Trypanosoma cruzi* em um paciente, o método sendo **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

35 contatar uma amostra de teste obtida de um paciente com uma fase sólida, em que a dita fase sólida tem imobilizados nesta os quatro polipeptídeos recombinantes FP3, FP6, FP10 e TcF como bandas teste separadas, e um primeiro controle e um segundo controle,

ainda em que o primeiro controle ou o segundo controle é imobilizado na fase sólida em uma concentração que é menor do que o outro controle de modo a compreender um controle baixo;

contatar a fase sólida com pelo menos um reagente de detecção;

5 detectar a ligação de anticorpos presentes na amostra de teste identificando-se a presença de um sinal em cada uma das bandas teste;

comparar a intensidade de qualquer sinal identificado em uma banda teste para um polipeptídeo recombinante com a intensidade do sinal do controle baixo;

10 em que a identificação de um sinal em pelo menos duas bandas teste dos polipeptídeos recombinantes indica a presença de *T. cruzi* na dita amostra de teste, contanto que pelo menos um dos sinais identificados em uma banda teste para um polipeptídeo recombinante tenha uma intensidade comparável àquela do controle baixo.

15 10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a amostra de teste é selecionada do grupo que consiste de sangue, soro, plasma, saliva, fluido cérebro-espinhal e urina.

11. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a dita fase sólida é selecionada do grupo que consiste de nitrocelulose, náilon, plástico e papel.

20 12. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fase sólida tem ainda imobilizado nesta pelo menos um polipeptídeo recombinante adicional selecionado do grupo que consiste de JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 e SA85-1.1.

25 13. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a dita fase sólida é uma tira tendo os ditos polipeptídeos imobilizados nesta.

Figura 1

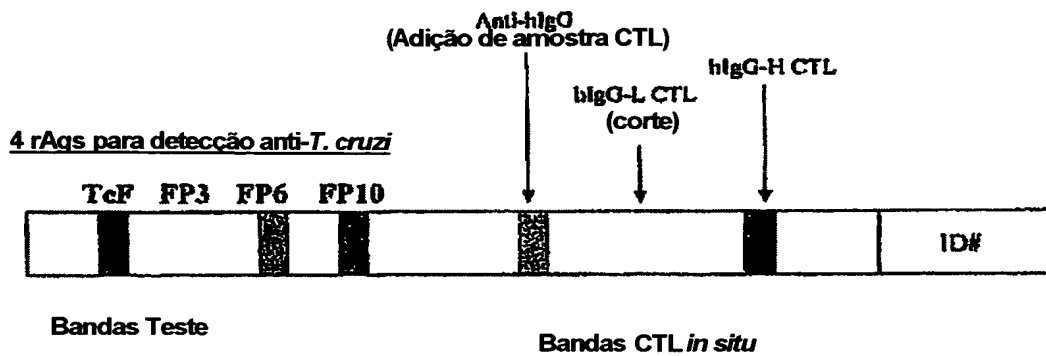


Figura 2

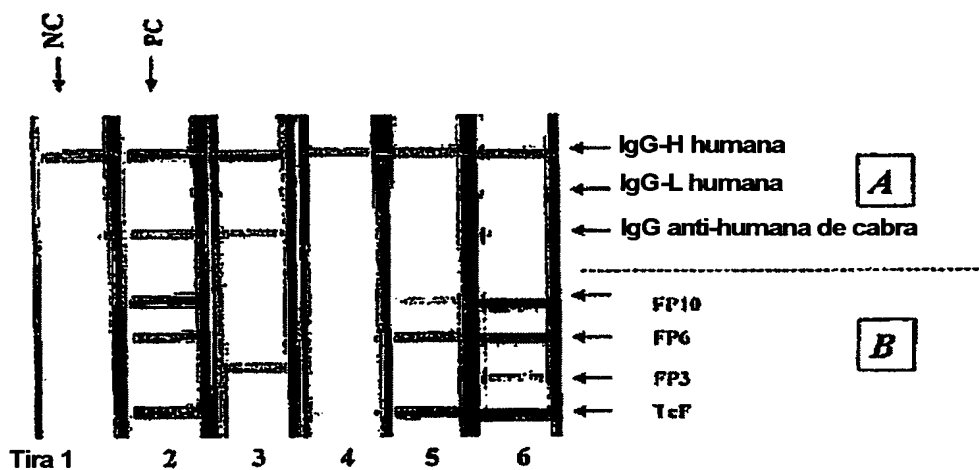
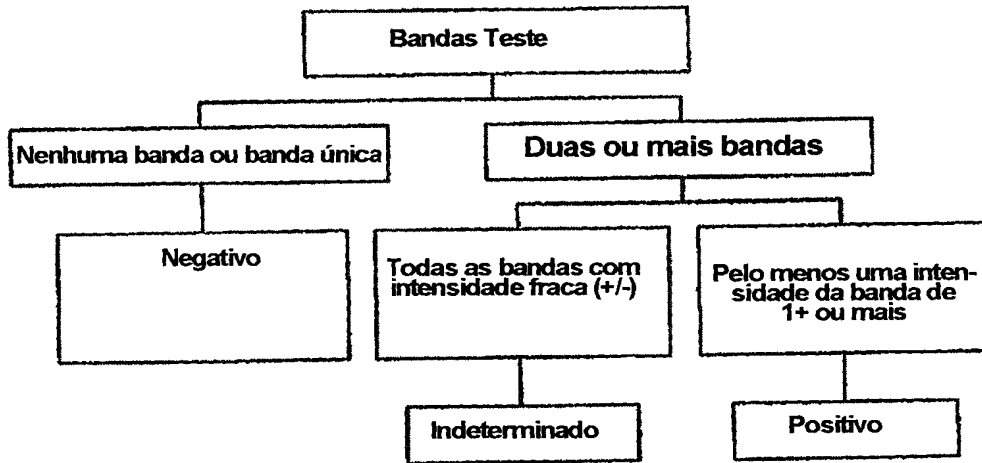


Figura 3



RESUMO

"MÉTODOS PARA A DETECÇÃO E DIAGNOSE DE INFECÇÃO POR
TRYPANOSOMA CRUZI"

A presente invenção refere-se à diagnose de infecção por *Trypanosoma cruzi*.