

MYLLENA DE FÁTIMA ALHEIROS DIAS MELO

AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA DETECÇÃO DE
TRYPANOSOMA CRUZI EM SORO E EM SANGUE DE PACIENTES COM DOENÇA DE
CHAGAS CRÔNICA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Yara de Miranda Gomes, BSc, MSc, PhD.

Co-orientadora: Constança Felícia de Paola Britto, BSc, MSc, PhD.

Recife
2010

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

M528m Melo, Myllena de Fátima Alheiros Dias.

Avaliação da reação em cadeia da polimerase na detecção de *trypanosoma cruzi* em soro e em sangue de pacientes com doença de chagas crônica/ Myllena de Fátima Alheiros Dias Melo. — Recife: M. F. A. D. Melo, 2010.

135 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Yara de Miranda Gomes, Co-orientadora: Constança Felícia de Paola Britto.

1. Doença de Chagas - diagnóstico. 2. Reação em Cadeia da Polimerase. 3. *Trypanosoma cruzi*. I. Gomes, Yara de Miranda. II. Britto, Constança Felícia de Paola. III. Título.

CDU 616.937

MYLLENA DE FÁTIMA ALHEIROS DIAS MELO

AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA DETECÇÃO DE
TRYPANOSOMA CRUZI EM SORO E EM SANGUE DE PACIENTES COM DOENÇA DE
CHAGAS CRÔNICA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovado em : 05 /03 /2010

Banca examinadora



Dra. Maria Helena Neves
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ



Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Universidade Federal de Pernambuco



Dra. Yara de Miranda Gomes
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dedico este trabalho

*A minha eterna amiga de hoje e sempre,
Virginia Maria Barros de Lorena e ao meu
grande amor, Luciano Beltrão.
Um grande beijo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me iluminado e me dado tantos amigos e realizações profissionais durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu grande amor, Luciano, pelo companheirismo, pelo seu amor, sua compreensão e seu entusiasmo. Seus conselhos e franquezas, mesmo sendo engenheiro mecânico, ajudaram e muito no meu trabalho.

À minha mãe, e ao meu pai, Fátima e Celso, por terem me ensinado o prazer de aprender e, sobretudo, o amor, respeito e atenção.

Às minhas irmãs, Myrella e Marília, pelas grandes lições que aprendemos juntas em nossa vida familiar.

Aos meus novos pais, dona Carmen e seu Sérgio pelo imenso amor que existe entre nós.

As minhas cunhadas Karla e Karina e seus respectivos maridos, Marcondes e Jack. E aos meus lindos sobrinhos, Yoana e Arthur. E claro que não poderia faltar, minha amiga Preta e seu feijão delicioso.

À Dra. Yara Gomes, por ter me orientado desde a iniciação científica até o mestrado, dando-me a oportunidade de crescer cientificamente, e por acreditar no meu trabalho.

À Dra. Constança Britto, por ser uma pessoa especial e ter mais que me orientado, por ter confiado em meu trabalho e por ter me ajudado mais intensamente na etapa final.

Ao Dr. Fábio Melo, meu grande chefe “oião”, pela sua atenção em me ensinar e orientar durante os experimentos e, “veja bem...”

Ao meu amigo Roberto Werkhauser, por ser a pessoa, que eu já conheci, mais inteligente e sabedora das ciências. Por ter “perdido” alguns milhares de minutos para tentar solucionar minhas eternas dúvidas, e que sempre contribuiu com palavras sinceras.

Às minhas amigas Alinne Verçosa, minha eterna co-orientadora - a cori e Raquel Machado a menina de papas na língua, pela força e amizade.

À Mineo Nakazawa e à Adriene Melo (Adri) pela ajuda durante os ensaios e pelas boas palavras, além da amizade que foi construída durante esses anos.

Ao meu colega de sala e amigo, José F. Marinho, o Júnior, pela companhia durante as disciplinas que pagamos juntos e pelo companheirismo durante as dúvidas e busca pelas respostas de nossos trabalhos.

A todos que compõem o Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pela amizade construída durante estes anos.

A secretária mais charmosa e especial de todo o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Simone Santos, a nossa Mone, pela grande amizade, pelo ombro amigo e pelas grandes gargalhadas de todos os dias.

Ao grupo Chagas que sempre esteve comigo em todos os momentos, em especial as minhas amigas "ARVRIS", Sim é isso mesmo. Somos uma floresta de árvores que Deus nos ilumina, para, juntas ou longe, possamos produzir maravilhosos frutos. Obrigada Sú, Izaurinha, Vi e claro o broto também, minha aluna de iniciação científica Priscilla.

À Fabiana Letícia, Andréia Barros, Roni Evêncio e Joelma Souza pela amizade extra laboratorial, pela força e incentivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da bolsa a mim creditada durante todo o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro deste trabalho.

À coordenação da pós-graduação e à secretaria acadêmica, pelo apoio constante.

À Mácia, bibliotecária do CPqAM/Fiocruz, pelos artigos científicos fornecidos.

Ao Setor de Transporte do CPqAM/Fiocruz, por disponibilizar a viatura ao Ambulatório de Doença de Chagas do HUOC e em especial a Luciano pelas

palavras e paciência nos dias em que passávamos do tempo da hora do almoço dele.

Ao setor de reprografia, em especial a Sara, pela amizade construída durante esses anos.

Ao Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz-UPE, pela permissão para seleção de pacientes chagásicos cadastrados. Em especial à Dra Glória Cavalcanti e à “Mãe” que nos apoiaram e contribuíram nos dias de coleta.

Aos pacientes chagásicos e indivíduos saudáveis que aceitaram participar deste estudo e contribuir para o progresso da ciência, conscientes de que podem até não estar sendo beneficiados diretamente, mas que o benefício de sua colaboração será proporcionado a todos os chagásicos.

Ao laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do IOC/Fiocruz no Rio de Janeiro, em especial a Ana Rodrigues e a Maria Angélica Cardoso, pelo tempo e aprendizado sobre a técnica de extração e PCR que me foi oferecido, além da amizade.

A todos, o meu muito obrigada!

MELO, Myllena de Fátima Alheiros Dias. **Avaliação da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Trypanosoma cruzi* em soro e em sangue de pacientes com doença de Chagas crônica.** 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

RESUMO

O diagnóstico sorológico da doença de Chagas apresenta algumas desvantagens, tanto na fase aguda devido à falta de *kits* comerciais aprovados pela ANVISA, quanto na fase crônica, nos casos de diagnósticos inconclusivos ou discordantes, além de não ser o método ideal para diagnosticar a infecção por transmissão congênita. Uma alternativa para a confirmação é o uso da técnica da PCR que apresenta alta sensibilidade e especificidade. No presente trabalho, objetivou-se avaliar a eficácia da ferramenta da biologia molecular, indicada pelo Ministério da Saúde como diagnóstico confirmatório da doença de Chagas, a PCR, utilizando amostras de soro como um potencial meio de extração de DNA do parasito. Para isso, foram coletadas amostras de sangue e soro de 65 pacientes chagásicos (FC=39, FM=10, FD=5, FI=9 e DES=2), selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Todos os pacientes foram avaliados clinicamente para caracterização das formas clínicas e realizaram exames confirmatórios para infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, também foram coletadas amostras de 35 indivíduos não chagásicos (área endêmica=9 e área não endêmica=26) que apresentaram sorologia negativa para infecção. Inicialmente, foram analisadas três formas de extração do material de sangue e soro. Após a escolha da melhor forma de extração, as amostras de sangue e soro dos pacientes chagásicos crônicos e não chagásicos foram aplicadas na técnica de PCR com a finalidade de avaliar a sensibilidade e especificidade, como também a concordância dos resultados. Ocorreu predominância da forma cardíaca (60%) entre os portadores da infecção pelo *T. cruzi*. Os resultados da técnica de PCR, utilizando amostras de soro, apresentaram uma sensibilidade estatisticamente superior (61,3%) à amostra de sangue (41,5%). Quando analisado o resultado utilizando as amostras simultaneamente (sangue e soro), obteve-se um valor da sensibilidade aumentado para 78,5%, sendo estatisticamente semelhante ao obtido com o soro e diferente com o sangue. O resultado da estatística mostrou que não existiram diferenças entre as especificidades analisadas. A concordância observada foi de 77,9% (sendo considerada “boa”) com amostras de soro. Portanto, a técnica de PCR aqui padronizada, por apresentar fácil leitura dos resultados, é um potencial método molecular a ser aplicado em laboratórios de diagnóstico para confirmação de resultados inconclusivos.

Palavras-chave: Doença de Chagas – diagnóstico; Reação em Cadeia da Polimerase; *Trypanosoma cruzi*.

MELO, Myllena Alheiros Fátima Dias. **Evaluation of polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in serum and blood of patients with chronic Chagas' disease.** 2010. Dissertation (Masters in Public Health) - Research Center Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

ABSTRACT

The serological diagnosis have some drawbacks, both in the acute phase due to lack of commercial *kits* approved by the ANVISA, and chronic phase, in cases of inconclusive or conflicting diagnoses, and serology is not the ideal method for diagnose infection by congenital transmission. An alternative to confirm the diagnosis of the disease is the use of PCR, because it has high sensitivity and specificity. The present study aimed to evaluate the effectiveness of the tool of molecular biology, designated by the Ministry of Health as a confirmatory diagnosis of Chagas disease, PCR, using serum samples as a potential means of extraction of parasite DNA. For this end, samples of blood and serum from 65 patients with Chagas disease were collected (CF=39, MF=10, DF=5, IF=9 and UNK=2), selected in Ambulatory of Chagas Disease of the Hospital Universitário Oswaldo Cruz. All patients were clinically evaluated for characterization of clinical forms and performed confirmatory tests for infection by *T. cruzi*. In addition, samples were collected from 35 non chagasic individuals (endemic area=9 and non-endemic area=26) tested negative for infection by *T. cruzi*. Initially, we analyzed three ways of extracting the material from blood and serum. After choosing the best extraction, samples of blood and serum from patients with chronic Chagas disease and individuals non chagasic were used in the PCR in order to evaluate the sensitivity and specificity of the technique, but also the agreement of the results. There was predominance of the heart form (60%) among patients with the infection by *T. cruzi*. The results of PCR using serum samples showed a statistically higher sensitivity (61.3%) than blood sample (41.5%). When analyzing the results using the two samples (blood and serum), we obtained a value of the sensitivity increased to 78.5%, statistically similar to that obtained with serum and with different blood. The result of the statistics showed that there were no differences between the characteristics analyzed. The concordance rate was 77.9% (being considered "good") with serum samples. Therefore, the PCR standard here, for presenting the results easy to read, is a potential molecular method to be applied in diagnostic laboratories for confirmation of inconclusive results.

Key- words: Chagas' disease - diagnosis; Polymerase Chain Reaction; *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
FIGURA 1-	Doença de Chagas: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
FIGURA 2-	Esquema geral da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> mostrando as principais estruturas celulares.....	25
FIGURA 3-	Representação esquemática do minicírculo mostrando a organização das quatro regiões conservadas (retângulos em azul), de aproximadamente 120 pb cada, contendo os blocos de seqüências mais conservadas da molécula: BSC-1, BSC-2 e BSC-3 (retângulos em preto).....	27
FIGURA 4-	Protocolo da extração através do fenol-clorofórmio <i>in house</i>	39
FIGURA 5-	Fragmentos amplificados do gene de <i>T. cruzi</i> pela PCR limite de detecção realizada segundo protocolo de Moser.....	48
FIGURA 6 –	Fragmentos amplificados do gene de <i>T. cruzi</i> pela PCR limite de detecção realizada segundo protocolo de Russomando.....	48
FIGURA 7 –	Fragmentos da amplificação do gene de <i>T. cruzi</i> pela PCR limite de detecção segundo ciclagem de Moser et al., (1989) utilizando 25 pmol (A) e 50 pmol (B) de cada <i>primer</i>	49
FIGURA 8 –	Fragmentos amplificados do gene de <i>T. cruzi</i> pela PCR utilizando 35 ciclos.....	50
FIGURA 9 –	Fragmentos amplificados do gene de <i>T. cruzi</i> pela PCR utilizando 40 ciclos.....	50
FIGURA 10 –	Fragmentos amplificados do gene de <i>T. cruzi</i> pela PCR aplicando DNA obtido de amostras de soro de pacientes chagásicos extraídas com o <i>kit</i> da marca Qiagen®.....	52
FIGURA 11 –	Perfil de fragmentos amplificados pela PCR com DNA obtido de amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos.....	54
FIGURA 12 –	Perfil de fragmentos amplificados pela PCR quando empregado o gradiente de temperaturas de anelamento.....	55
FIGURA 13 –	Perfil de fragmentos amplificados pela PCR utilizando menores quantidades de DNA extraído de amostras de sangue de pacientes chagásicos.....	56

FIGURA 14 – Fragmentos da amplificação de DNA do gene de <i>T. cruzi</i> obtido de amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos produzidos pela PCR utilizando diferentes concentrações de <i>primers</i>	57
FIGURA 15 – Fragmentos da amplicação do DNA de <i>T. cruzi</i> pela PCR utilizando DNA obtido da reconstituição de amostras de sangue de indivíduos não chagásicos contendo concentrações decrescentes de células de <i>T. cruzi</i> para o estabelecimento do limite de detecção.....	58
FIGURA 16 – Fragmentos da amplicação do DNA de <i>T. cruzi</i> pela PCR utilizando DNA obtido da reconstituição de amostras de soro de indivíduos não chagásicos contendo concentrações decrescentes de células de <i>T. cruzi</i> para o estabelecimento do limite de detecção.....	59
FIGURA 17 – Amplificação do DNA de <i>T. cruzi</i>	60
FIGURA 18 – Fragmentos da amplificação do gene de <i>T. cruzi</i> pela PCR utilizando os <i>primers</i> modificados com as amostras de sangue de indivíduos chagásicos crônicos que apresentaram resultado negativo na PCR utilizando os <i>primers</i> TCZ1 e TCZ2.....	64
FIGURA 19 – Especificidade e sensibilidade da PCR utilizando os diferentes tipos de amostras.....	66

LISTA DE TABELAS

	Pág.	
TABELA 1-	Representação da ciclagem de Moser.....	36
TABELA 2-	Representação da ciclagem de Russomando.....	37
TABELA 3-	Representação da ciclagem com os <i>primers</i> modificados da região satélite.....	46
TABELA 4-	Escala de concordância do indicador <i>Kappa</i>	46
TABELA 5-	Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença....	47
TABELA 6-	Resultados das PCR utilizando DNA de amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos obtido através de diferentes métodos de extração versus a quantidade de DNA purificado (ng).....	52
TABELA 7-	Formas clínicas dos pacientes chagásicos estudados.....	53
TABELA 8-	Resultados da PCR com os <i>primers</i> TCZ1 e TCZ2 frente à amostra utilizada dos pacientes chagásicos.....	61
TABELA 9-	Resultados da PCR β -globina das amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos frente aos resultados da PCR TCZ1 e TCZ2.....	62
TABELA 10-	Resultados da PCR β -globina das amostras de sangue de indivíduos não chagásicos frente aos resultados da PCR TCZ1 e TCZ2.....	62
TABELA 11-	Resultado da PCR β -globina das amostras soro de pacientes chagásicos crônicos.....	63
TABELA 12-	Resultados da PCR β -globina das amostras soro de indivíduos não chagásicos frente aos resultados da PCR TCZ1 e TCZ2.....	63
TABELA 13-	Comparação dos resultados obtidos pela PCR em amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos frente aos resultados da sorologia.....	65
TABELA 14-	Associação dos resultados de PCR positivo em soro e sangue e formas clínicas dos pacientes chagásicos crônicos.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO	<i>Cut-off</i>
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DES	Desconhecida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
DTUs	<i>Discret Typing Units</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FC	Forma cardíaca
FD	Forma digestiva
fg	Fentograma
FI	Forma indeterminada
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FM	Forma mista
h	Hora
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
mA	Miliampere
min	Minuto
mL	Mililitro
N	Número de amostra
NC	Não-chagásico
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PBS	Tampão Salino – Fosfato

PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Pernambuco
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
pmol	Picomoles
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UPE	Universidade de Pernambuco
WHO	<i>World Health Organization</i>
xg	Aceleração da gravidade
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Objetivos.....	19
1.1.1 <i>Objetivo geral.....</i>	19
1.1.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos da doença de Chagas.....	20
2.1.1 <i>Situação epidemiológica da doença de Chagas.....</i>	20
2.1.2 <i>Fases e formas clínicas da doença de Chagas.....</i>	22
2.2 Agente etiológico da doença de Chagas.....	23
2.2.1 <i>Biologia do parasito.....</i>	23
2.3 Diagnóstico da doença de Chagas.....	28
2.3.1 <i>Diagnóstico convencional da doença de Chagas.....</i>	28
2.3.2 <i>Diagnóstico molecular da doença de Chagas.....</i>	29
2.3.3 <i>Materiais biológicos para obtenção de DNA de T. cruzi.....</i>	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Obtenção de tripomastigotas.....	34
3.1.1 <i>Extração de DNA de T. cruzi.....</i>	34
3.1.2 <i>Dosagem do DNA extraído.....</i>	35
3.2 Padronização da PCR.....	35
3.2.1 <i>Condições de ciclagem e reagentes.....</i>	35
3.2.2 <i>Tipos de extração.....</i>	38
3.3 Definição da população de estudo.....	40
3.3.1 <i>Pacientes.....</i>	40
<u>3.3.1.1 <i>Coleta das amostras.....</i></u>	<u>40</u>

<u>3.3.1.2 Questões éticas</u>	41
<u>3.3.1.3 Diagnóstico Sorológico</u>	41
<u>3.3.1.4 Classificação e procedência dos pacientes</u>	42
<u>3.3.1.5 Extração de DNA das amostras clínicas</u>	42
<u>3.3.1.6 Dosagem de DNA das amostras clínicas</u>	42
3.3.2 <i>Otimização da técnica de PCR em amostras clínicas</i>	42
<u>3.3.2.1 Gradiente de temperaturas de anelamento</u>	43
<u>3.3.2.2 Quantidade de DNA alvo</u>	43
<u>3.3.2.3 Quantidade de primers</u>	43
3.3.3 <i>Limite de detecção da PCR em amostras reconstituídas</i>	44
3.4 Aplicação da PCR para a detecção de DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em amostras de sangue e de soro	44
3.4.1 <i>Ensaio de PCR para o gene da β-globina humana</i>	45
3.4.2 <i>Utilização de novos primers para as seqüências nucleares satélites</i>	45
3.5 Análises estatísticas dos dados	46
3.5.1 <i>Teste de concordância</i>	46
3.5.2 <i>Sensibilidade e especificidade</i>	47
3.5.3 <i>Análise estatística</i>	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Padronização da PCR	48
4.1.1 <i>Condições de ciclagem e reagentes</i>	48
4.1.2 <i>Tipos de extração</i>	50
4.2 População de estudo	52
4.2.1 <i>Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes</i>	52
4.2.2 <i>Dosagem de DNA das amostras clínicas extraídas pelo kit Qiagen®</i>	53
4.2.3 <i>Otimização da técnica de PCR em amostras clínicas</i>	53

<u>4.2.3.1 PCR em amostras de sangue</u>	54
<u>4.2.3.1.1 Gradiente de temperaturas de anelamento</u>	54
<u>4.2.3.1.2 Quantidade de DNA alvo</u>	55
<u>4.2.3.2 PCR em amostras de Soro</u>	56
<u>4.2.3.2.1 Quantidade de primers</u>	57
<u>4.2.3.3 Limite de detecção da PCR em amostras reconstituídas</u>	58
4.3 Aplicação da PCR para a detecção de DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em amostras de sangue e soro	59
4.3.1 Amostras de sangue.....	60
4.3.2 Amostras de soro.....	61
4.3.3 Ensaio de PCR para o gene β -globina humana.....	62
4.3.4 Utilização de novos primers para as seqüências nucleares satélites de <i>T. cruzi</i>	64
4.4 Análise estatística dos dados	65
4.4.1 Sensibilidade e especificidade.....	65
4.4.2 Teste de concordância.....	66
4.4.3 Formas clínicas X PCR.....	67
4.4.4 Idade X Formas clínicas X Sexo.....	68
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÕES	70
7 PERSPECTIVAS	80
REFERÊNCIAS	81
Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o pacientes.....	97
Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduo não portador da doença de Chagas.....	98
Apêndice C – Questionário clínico-epidemiológico.....	99
Apêndice D – Artigo em preparação.....	100
Anexo A – Comissão de Ética do CPqAM/Fiocruz.....	135

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é circunscrita à América Latina e recentemente, com a disseminação da doença, diversos países da Europa e EUA apresentam casos de infecção (GARRAUD et al., 2007; KIRCHHOFF, 1993; KIRCHHOFF et al., 2006; KIRCHHOFF, PEARSON, 2007; SCHUMUNIS, 2007). Estima-se que a prevalência da infecção humana é de 12 milhões de casos e que cerca de 28 milhões de pessoas estão sob risco de infecção (DIAS et al., 2008). O agente etiológico desta doença é o *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado que pode ser transmitido à espécie humana através das vias vetorial, transfusional, oral, congênita, por acidentes de laboratório e hospitalar e transplante de órgãos contaminados (DIAS, 2000; FERREIRA; ÁVILA, 2001).

No Brasil, a prevalência da infecção por *T. cruzi* em gestantes se encontra na faixa entre 0,3 a 33% (GONTIJO et al., 2009), justificando a pesquisa da infecção pelo *T. cruzi* nos exames pré-natais e em recém-nascidos filhos de mães chagásicas. Além disso, nesse país, várias ocorrências recentes de surtos por transmissão oral têm sido documentadas, estando geralmente relacionadas a presença de vetores e/ou reservatórios infectados nas imediações do evento (LAINSON et al., 1980; SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; VALENTE et al., 1999; VALENTE, 2005), levantando a preocupação sobre o ressurgimento da doença no Brasil nos próximos anos.

Em virtude da magnitude da infecção, de sua elevada morbimortalidade que gera um grande impacto social e médico-trabalhista (BRASIL, 2005; MALTA, 1996), além da quase ineficácia do tratamento etiológico na fase crônica, justificam-se estudos que visem à melhoria da qualidade de vida dos portadores da doença de Chagas, como também a detecção precoce da infecção.

Considerando que não se dispõem, na rotina laboratorial, de métodos sorológicos e parasitológicos que apresentem altas especificidade e sensibilidade em ambas as fases da doença, este trabalho propõe a avaliar um método molecular para detecção do DNA de *T. cruzi*, que possa ser utilizado durante a fase crônica da infecção, assim como, futuramente, para o diagnóstico de fase aguda e em casos de infecção congênita.

Um exemplo dessas abordagens moleculares é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que apresenta uma alta sensibilidade e especificidade na amplificação de seqüências tanto de DNA do cinetoplasto quanto DNA nuclear de *T. cruzi* (BRITTO et al., 1993; BRITTO et al., 1995; DIAZ et al., 1992; GOMES et al., 1998; MOSER et al., 1989; STURM et al., 1989;). Uma grande vantagem desta técnica é a obtenção dos resultados em tempo mínimo, em contrapartida aos métodos parasitológicos indiretos, que apresentam seus resultados após semanas ou até meses (LUQUETTI; RASSI, 2000; YANG; ROTHMAN, 2004). Outras vantagens da PCR são sua simplicidade de execução, além da possibilidade de repetição dos testes em caso de resultados duvidosos, uma vez que esta técnica utiliza pequenos volumes do material clínico (MARIN et al., 2002; YANG; ROTHMAN, 2004).

Com o intuito de tentar aperfeiçoar o diagnóstico da doença de Chagas e assim definir um método molecular que apresente elevadas sensibilidade e especificidade, vários grupos de pesquisa tentam avaliar a PCR como a técnica de diagnóstico para neonatos nascidos de mães chagásicas, indivíduos suspeitos de contaminação oral e principalmente confirmar os diagnósticos inconclusivos gerados pelos testes sorológicos (RUSSOMANDO et al., 1998; VIRREIRA et al., 2003).

A PCR tem apresentado resultados extremamente promissores, permitindo que essa metodologia seja utilizada como teste confirmatório. Embora recomendado pelo Ministério da Saúde, apenas em 2005, foi estabelecido um consórcio para padronizar e validar um protocolo único de diagnóstico da doença de Chagas multinacional e desta forma estabelecer um protocolo consenso para ser empregado por todos os grupos que praticam o teste molecular na sua rotina diagnóstica.

Comumente a amostra utilizada para amplificação do material genético do parasito pelo método de PCR é quase sempre o sangue total. Uma das dificuldades em inquéritos epidemiológicos é a coleta do material em áreas bastante distantes dos laboratórios onde serão processadas e analisadas. Contudo, Ávila et al. (1991) desenvolveram uma técnica eficiente de preservação do sangue total para posterior utilização em PCR, misturando-o a uma solução de Guanidina-EDTA. Porém, esta metodologia acarreta um aumento em mais uma etapa do processo, além deste composto poder apresentar inibidores da PCR reduzindo assim sua sensibilidade de detecção do parasito (KIRCHHOFF et al., 1996).

Uma grande perspectiva para o diagnóstico molecular da infecção é a detecção do DNA em soro de pacientes chagásicos. A literatura demonstra que não existem diferenças significativas entre o uso de amostras de soro e sangue total (RUSSOMANDO, et al.,1992). Além disso, haveria a facilidade de utilizar uma mesma amostra coletada para diagnóstico sorológico, método de escolha de diagnóstico indicado pelo Ministério da Saúde. Sendo desta forma, o soro pode vir a ser um potencial meio de extração de DNA do parasito para o diagnóstico molecular da doença de Chagas. É por meio desta abordagem que o presente trabalho avaliou o desempenho da técnica de PCR na detecção de DNA de *T. cruzi* a partir de amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos crônicos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia da PCR como método de detecção de *T. cruzi* em soro e em sangue de pacientes com doença de Chagas crônica, utilizando seqüências nucleares repetitivas do parasito como alvo de amplificação.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar e comparar a sensibilidade e especificidade da PCR convencional realizada em amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos crônicos;
- b) Avaliar a concordância dos resultados da PCR convencional em amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos crônicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos da doença de Chagas

2.1.1 Situação epidemiológica da doença de Chagas

A doença de Chagas foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas (CHAGAS, 1909), e completou cem anos de descobrimento em 2009. Ainda hoje é a doença mais negligenciada do mundo. Os indicadores mostram que do montante de investimentos de iniciativas públicas e privadas apenas 0,25% é destinada a doença de Chagas, além de que há 30 anos foram desenvolvidos quase 2000 medicamentos para diferentes enfermidades, sendo apenas 21 para outras doenças negligenciadas e nenhum para a doença de Chagas (HOTEZ et al., 2006; STOBBAERTS, 2009).

A infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, ainda representa um grande problema de saúde pública em 15 países endêmicos. A enfermidade é circunscrita à América Latina, onde se estima que a prevalência da infecção humana seja de cerca de 12 milhões de casos e que cerca de 28 milhões de pessoas estejam sob o risco de infecção (DIAS et al., 2008).

Outros países da Europa e os Estados Unidos da América apresentam casos de infecção através da transmissão transfusional (GARRAUD et al., 2007; KIRCHHOFF, 1993; KIRCHHOFF et al., 2006; KIRCHHOFF; PEARSON 2007; SCHUMUNIS, 2007) como consequência da imigração de indivíduos latinos americanos oriundos de regiões endêmicas para Chagas.

Apenas no início da década de 90 é que se teve o marco do combate à doença de Chagas na América do Sul. Países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) empregaram milhões de dólares no controle do vetor, medida conhecida como “Ação para eliminar o *Triatoma infestans*”, além de investir na implementação de testes sorológicos nos bancos de sangue, sendo esta ação denominada de “Iniciativa do Cone Sul” (BRICEÑO-LEON, 2009; MOLYNEUX; MOREL, 1998; TARTAROTTI et al., 2004).

O lento início das atividades de controle por parte de países que desconhecem a condição dos seus próprios territórios também é um agravante relativo a essas ações (DIAS, 2006). Recentemente, graças ao amadurecimento da comunidade científica e o avanço de acordos entre países endêmicos, surgiram outros grupos de combate à doença de Chagas, como a “Iniciativa Andina”, envolvendo Colômbia, Equador, Peru e Venezuela, que tem como objetivo controlar os vetores *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. maculata* e *R. ecuadoriensis*, e a “Iniciativa Centroamericana”, organizada por países da América Central (Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua e Panamá), que tem como alvo as espécies *T. dimidiata* e *R. pallenscens* além do *R. prolixus* (BRICEÑO-LEON, 2009; GUHL; VALLEJO, 1999; PONCE, 1999). Manaus sediou o encontro entre a Organização Pan-Americana de Saúde e nove países. O intuito foi criar uma nova iniciativa dos países amazônicos para Prevenção e Controle da Doença de Chagas (AMCHA), sendo esta adicionada as outras três iniciativas intergovernamentais (Cone Sul, Andina e Centro americana) no programa da doença de Chagas para as Américas (BRICEÑO-LEON, 2009). A consolidação das atividades de controle constitui-se um fator fundamental para a determinação do cenário da doença.

Apesar de o Brasil ser considerado livre da transmissão vetorial (DIAS, 2006), várias ocorrências recentes de surtos por transmissão oral têm sido documentadas, estando geralmente relacionadas a presença de vetores e/ou reservatórios infectados nas imediações do evento (LAINSON et al., 1980; NOBREGA et al., 2009; SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; STEINDEL et al., 2007; VALENTE et al., 1999; VALENTE, 2005).

A partir do surto de transmissão oral relatado em Santa Catarina (STEINDEL, et al., 2007), tem-se observado um aumento na ocorrência de novos casos, seja pelo aumento da capacidade de detecção dos serviços, seja por fatores relacionados à própria transmissão da doença.

Outro agravante que possibilita a reemergência da transmissão vetorial está relacionado à presença de espécies consideradas vetores secundários, como *T. sordida*, *T. brasiliensis* e, em algumas áreas, *P. megistus* (OLIVEIRA FILHO, 1999), levantando a preocupação sobre o ressurgimento da doença no Brasil nos próximos anos. Atualmente, as principais vias de transmissão no país são a oral e a transplacentária. Esta última pode ocorrer em qualquer período da infecção materna,

apresentando uma prevalência de 5 a 40% dependendo da área geográfica. No Brasil, a prevalência de infecção congênita pelo *T. cruzi* varia entre 0,3 e 33% (BRUTUS et al., 2008; GONTIJO et al., 2009; MORA et al., 2005).

Apesar dos esforços para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes contra a doença, apenas dois estão disponíveis para o tratamento (benzanidazol e nifurtimox). Esses, por sua vez, são mais eficazes quando iniciados na fase aguda, embora as percentagens de cura ainda apresentam dados divergentes (CANÇADO, 1985; RUSSOMANDO et al., 1998). Além disso, o potencial de cura parasitológica depende do tipo de cepa albergada pelo hospedeiro (ANDRADE et al., 1985; BRITTO, 2009; LACUNZA et al., 2006). Já na fase crônica tardia, ainda faltam evidências concretas de benefício pós-tratamento. Somando-se a isso ainda não existe uma vacina que previna a doença. A dificuldade de identificação de indivíduos chagásicos está na inexistência de expressão clínica específica entre os infectados que estão na fase aguda, e do longo período de latência observado na fase crônica, o que impede ou retarda, desta forma, o tratamento etiológico. Quanto mais cedo o tratamento é implementado, maior a chance de cura.

Mesmo com a morbimortalidade característica da doença, a assistência médica e social dos indivíduos infectados ainda é precária na maioria das áreas endêmicas, consistindo assim em um grande desafio na elaboração de políticas públicas de saúde (DIAS, 2006).

2.1.2 Fases e formas clínicas da doença de Chagas

A infecção chagásica apresenta uma fase aguda, com duração aproximada de 2 a 4 meses. Se a infecção ocorrer pela via vetorial, os indivíduos podem apresentar ou não os sinais de porta de entrada do parasito, sinal de Romaña ou chagoma de inoculação. Quando a clínica é aparente, manifestações como febre, mal-estar, anorexia e cefaléia são freqüentes. Além disso, o indivíduo pode apresentar manifestações sistêmicas como edema localizado ou generalizado, aumento de linfonodos, alterações exantemáticas, hepatomegalia, esplenomegalia, manifestações nervosas, além de comprometimento cardíaco, que podem ser observadas nesta fase (HUGGINS et al., 1996; PRATA, 2001). No entanto, a maioria

dos indivíduos na fase aguda pode não apresentar sintomatologia da doença. Devido aos sintomas muitas vezes passarem despercebidos, a doença pode não ser diagnosticada durante a fase aguda (PRATA, 2001) e a possibilidade de cura parasitológica com o uso de tratamento específico diminui.

Após a fase aguda da doença, o indivíduo pode permanecer num período de latência pelo resto da vida, não apresentando sinais e sintomas, apenas a sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*, caracterizando a forma clínica crônica indeterminada. Depois desse período ou gradativamente após a fase aguda, os infectados podem apresentar alterações em vários sistemas e órgãos, acometendo predominantemente o coração, esôfago, cólon e/ou sistema nervoso, o que vai caracterizar as diferentes formas clínicas sintomáticas desta fase (PRATA, 2001).

Os pacientes que apresentam a forma indeterminada podem evoluir para a forma cardíaca numa frequência de 2% a cada ano, gerando uma estimativa de cerca de 20-30% de pacientes chagásicos com algum tipo de alteração cardíaca (PRATA, 2001). Diversos são os sintomas encontrados na cardiopatia chagásica crônica, relacionados com quadros de insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo, além da morte súbita.

As manifestações digestivas apresentam uma frequência de cerca de 15 a 20% dos pacientes chagásicos, com taxa de incidência de 1,1% ao ano (CASTRO et al., 1994). Ocorrem alterações principalmente no esôfago e no cólon, evoluindo para a formação do megaesôfago e do megacólon, respectivamente. Também pode haver o acometimento de algum órgão do aparelho digestivo e do coração simultaneamente, caracterizando a forma clínica mista da doença de Chagas (GOMES, 1993). Menos frequentemente há alterações no sistema nervoso, caracterizando a forma clínica nervosa (PRATA, 2001).

2.2 Agente etiológico da doença de Chagas

2.2.1 Biologia do parasito

O *Trypanosoma cruzi* é um organismo eucarionte e unicelular pertencente à ordem Kinetoplastida, que compreende as famílias Bodonidae e Trypanosomatidae. O inseto transmissor, conhecido no Brasil como barbeiro, chupança, pertence a família dos Reduvidos (Reduviidae) podendo ser os gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*.

Após o repasto sanguíneo, o inseto defeca e através de feridas e escoriações na pele, ou direto na mucosa, o parasito penetra na circulação do hospedeiro na forma infectante (tripomastigota metacíclico). Os tripomastigotas penetram nas células do hospedeiro, onde se transformam em amastigotas e se multiplicam até romper a célula. Durante o rompimento celular, o parasito se encontra na forma tripomastigota sanguíneo, que após o rompimento, circulam na corrente sanguínea até invadirem novas células ou, após um novo repasto sanguíneo, os tripomastigotas voltam para o inseto. No vetor, o protozoário evolui para a forma epimastigota e se multiplica no tubo digestivo do inseto até que, no reto, evolui para a forma de tripomastigota metacíclica, forma infectante e presente nos excretas do inseto, que após um novo repasto, reinicia-se o ciclo infectando novos hospedeiros vertebrados (Figura 1).

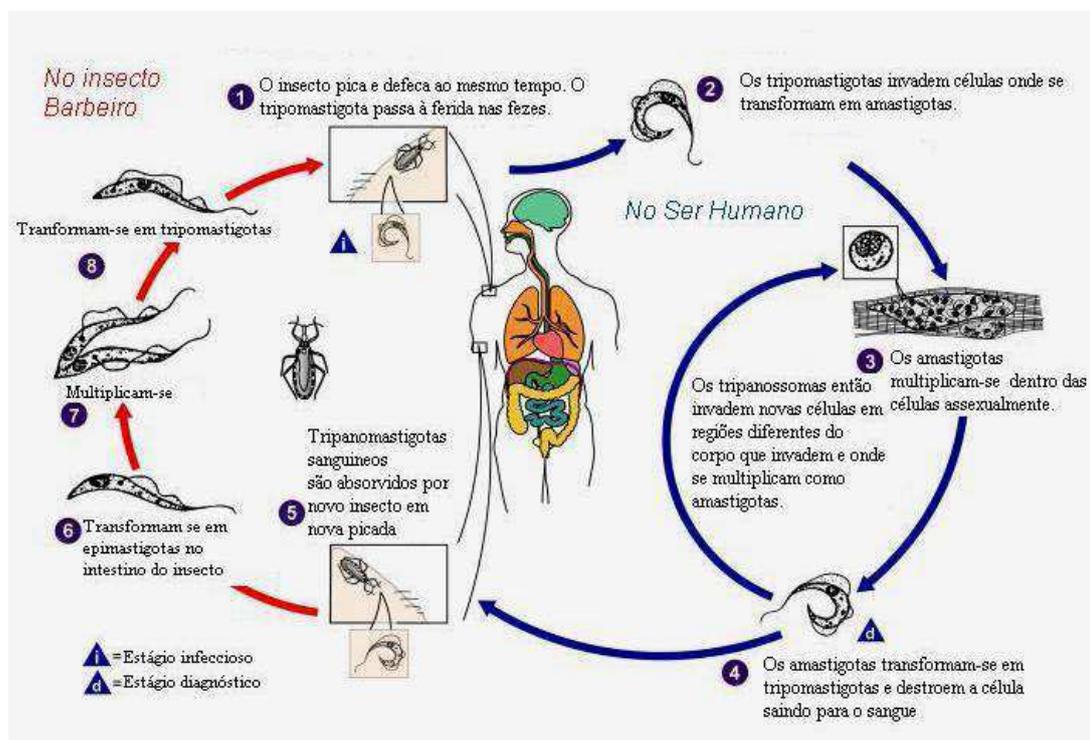


Figura 1: Doença de Chagas: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Center for Disease Control and Prevention modificado por Wikipédia.

O *T. cruzi* apresenta em todas as suas formas evolutivas dois tipos de genomas situados em diferentes compartimentos: no núcleo e na mitocôndria (Figura 2).

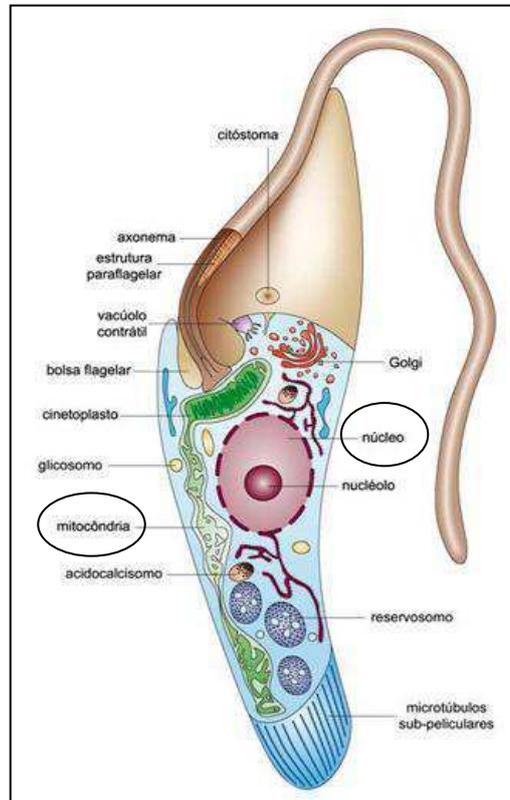


Figura 2: Esquema geral da forma epimastigota do *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares. Fonte: Docampo et al. (1974).

Apresentam um genoma nuclear diplóide, constituído de aproximadamente 100 a 250 $\times 10^6$ pares de bases (pb), sendo que 16 a 30% representa o genoma do kDNA. O conteúdo de DNA por célula é estimado entre 120 e 330 fg (CASTRO et al., 1981; DVORAK, 1993; HENRIKSSON et al., 1996; LANAR et al., 1981; MC DANIEL; SANTOS et al., 1997). Mesmo apresentando diferenças de quantidade de DNA, o cariótipo do *T. cruzi* apresenta-se estável nas diferentes formas evolutivas (WAGNER; SO, 1990).

A diversidade genética entre as cepas do *T. cruzi* está amplamente documentada. Esta característica levanta a questão se *T. cruzi* é uma única espécie ou um táxon artificial que inclui mais de uma espécie (DEVERA et al., 2003). Diversos estudos foram realizados para categorizar as diferentes cepas do parasito. Os primeiros trabalhos agruparam as cepas de acordo com os perfis eletroforéticos

de isoenzimas reunindo-as em três grupos chamados zimodemas Z1, Z2 e Z3 (MILES et al., 1978). Posteriormente, outros estudos (ÁVILA et al., 1990; MOREL et al., 1980) visaram buscar marcadores no genoma mitocondrial do parasito, onde as diferentes cepas e isolados puderam ser classificados em esquizodemas distintos com base nos perfis de restrição do DNA do cinetoplasto ou kDNA. Em 1999, a comunidade científica reuniu os isolados de *T. cruzi* em dois grupos principais que apresentam características epidemiológicas particulares, e estes passaram a ser denominados por grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMOUS..., 1999), presentes no ciclo silvestre e no ciclo doméstico de transmissão do parasito, respectivamente (BRIONES et al., 1999). Posteriormente, com base na análise de outros marcadores genéticos, foi proposta a constituição do grupo *T. cruzi* II em cinco sub-grupos (BRISSE et al., 2000), denominadas DTUs (*Discret Typing Units*) I, IIa, IIb, IIc, IId, IIe. Freitas et al. (2006) propuseram a existência de uma terceira linhagem principal em *T. cruzi*, designada de *T. cruzi* III ou Z III. Após a Segunda Reunião Satélite, um sistema de unificação da nomenclatura do agente causador da doença de Chagas foi estabelecido, e nesse consenso as cepas de *T. cruzi* foram agrupadas em seis DTUs denominados de *T. cruzi* I a VI (ZINGALES et al., 2009).

Nesses estudos, diferentes marcadores moleculares foram analisados para a caracterização de cepas e isolados do parasito, tais como os genes que codificam para RNA ribossomal, genes de mini-exon e regiões de mini-satélites (FERNANDES et al., 1998; GOMES et al., 1998; MACEDO et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1998, 1999; SOUTO; ZINGALES, 1993; TIBAYRENC et al., 1993; VAGO et al., 1996). Uma provável explicação para esta enorme variabilidade genética reside no fato do *T. cruzi* ser um organismo diplóide que se multiplica predominantemente por divisão binária. Desta forma, o genoma de cada isolado evolui independentemente (TYBAYRENC et al., 1986, TYBAYRENC; AYALA, 2002; ZHANG et al., 1988).

A rede de DNA circular do cinetoplasto, ou kDNA, totaliza cerca de 20 a 30% do DNA celular (CANO et al., 1995). Ele é composto por dois tipos de estruturas: os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos representam cerca de 50 cópias por célula (DESQUENCE; DÁVILA, 2002; KLINGBEIL; ENGLUND, 2004). São responsáveis pela codificação de proteínas da cadeia de transporte de elétrons e RNA ribossômico mitocondrial (SIMPSON et al., 1987; SIMPSON, 1987). Os minicírculos estão presentes nas células em cerca de 10.000 a 20.000 cópias e codificam RNAs guia que participam do processamento dos transcritos do

maxicirculo (DESQUENCE; DÁVILA, 2002; JUNQUEIRA et al., 2005). Em termos de organização estrutural, os minicirculos apresentam quatro regiões de seqüências conservadas, intercaladas por seqüências altamente variáveis que conferem uma enorme diversidade de classes de minicirculos por rede de kDNA (Figura 3) (DEGRAVE et al., 1988; STURM et al., 1989).

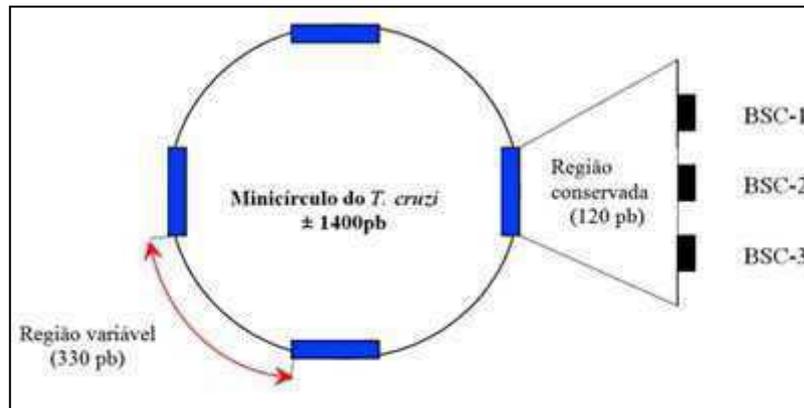


Figura 3: Representação esquemática do minicirculo mostrando a organização das quatro regiões conservadas (retângulos em azul), de aproximadamente 120 pb cada, contendo os blocos de seqüências mais conservadas da molécula: BSC-1, BSC-2 e BSC-3 (retângulos em preto). Fonte: Modificado de: Sturm, et al. (1989). Nota: As regiões com seqüências hiper-variáveis dos minicirculos de 330 pb (seta em vermelho) encontram-se intercaladas com as regiões conservadas.

No núcleo, encontram-se presentes seqüências repetitivas, que representam cerca de 40% do genoma nuclear e podem aparecer agrupadas ou dispersas no genoma. Exemplos dessas seqüências são os microsátélites e os minisátélites. Os microsátélites são seqüências pequenas de DNA (aproximadamente 6 nucleotídeos), e apresentam elevado grau de polimorfismo, principalmente no que diz respeito ao número de repetições em um dado locus (CASTRO et al., 1981; GONZÁLEZ et al., 1984; REQUENA et al., 1992). As seqüências de minisátélites são seqüências hipervariáveis, com aproximadamente 15 nucleotídeos na unidade repetitiva, presentes em milhares de cópias no genoma nuclear (JUNQUEIRA et al., 2005; KINGBELL; ENGLUD, 2004).

2.3 Diagnóstico da doença de Chagas

2.3.1 Diagnóstico convencional da doença de Chagas

Atualmente, o diagnóstico etiológico da doença de Chagas pode ser realizado através da detecção do parasito no organismo, utilizando métodos parasitológicos ou, através da detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi*, utilizando métodos sorológicos (LUQUETTI; RASSI, 2000). Assim, o Ministério da Saúde determina que para diagnosticar a infecção na fase aguda sejam escolhidos os métodos parasitológicos diretos através de observação ao microscópio, e que os métodos sorológicos sejam utilizados durante a fase crônica, que é caracterizada por baixa parasitemia (BRASIL, 2005).

Os métodos parasitológicos podem ser diretos (esfregaço, gota espessa, exame de sangue a fresco, método de Strout) ou indiretos, que permitem a reprodução artificial do ciclo do parasito (hemocultura e xenodiagnóstico) (CERISOLA et al., 1971; GOMES et al., 1997), são considerados sensíveis e apresentam alta especificidade nesta fase. Com relação ao diagnóstico sorológico na fase aguda, a busca por anticorpos da classe IgM, característicos desta fase, é pouco empregada devido à falta de *kits* comerciais aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela carência de controles positivos para IgM (BRASIL, 2005).

Em contrapartida, na fase crônica o diagnóstico é realizado principalmente pela pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* por testes sorológicos, devido à grande resposta humoral desenvolvida pelo hospedeiro (GOMES, 1996, 1997). Os métodos sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da doença de Chagas são Hemaglutinação Indireta (HAI), Imunofluorescência Indireta (IFI) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (BRASIL, 2005). Uma amostra é considerada reagente quando a sua absorvância for maior que o valor de *cut-off* estabelecido, e não reagente, quando for menor que o valor de *cut-off*, segundo as instruções do fabricante.

Um problema dos *kits* de diagnóstico sorológico é a inviabilidade de fornecer resultados fidedignos para os casos de transmissão congênita, pois a maioria dos recém-nascidos filhos de mães chagásicas apresenta anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG provenientes da mãe, o que favorece um diagnóstico falso-positivo (REYES et al., 1990). Outro problema é a dificuldade da confirmação sorológica nos casos de diagnósticos inconclusivos ou discordantes (GOMES et al., 1999; GRIJALVA et al., 1995). Desta forma, outros métodos como o Western blot e a PCR são indicados para confirmação do diagnóstico sorológico e parasitológico, porém são apenas implantados em laboratórios de referência, especializados em diagnóstico da doença de Chagas (BRASIL, 2005).

2.3.2 Diagnóstico molecular da doença de Chagas

Com a manipulação de material genético, surgiram várias técnicas moleculares que foram gradativamente aplicadas ao diagnóstico de doenças infecciosas (JACKSON et al., 1972; SOUTHERN et al., 1975).

As doenças emergentes e re-emergentes necessitam de diagnósticos mais rápidos, sensíveis e específicos, e como o diagnóstico convencional apresenta certas falhas, com resultados inconclusivos e discordantes, o Ministério da Saúde do Brasil, considerando a eficácia de técnicas moleculares como a PCR, adotou como um dos métodos para confirmação da doença de Chagas (BRASIL, 2005).

A literatura mostra que a técnica de PCR apresenta elevadas sensibilidade e especificidade na detecção de material genético do *T. cruzi* como observado em outros ensaios convencionais, parasitológico e sorológico (ÁVILA et al., 1993; BRITTO et al., 2001; GOMES et al., 1999, 2000; JUNQUEIRA et al., 1996; PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003).

O ensaio de PCR deve ser realizado em diferentes ambientes onde cada etapa é processada, devendo ser cuidadosamente bem estabelecidos para evitar contaminações resultando em diagnósticos discordantes. Outro ponto importante é a escolha dos *primers*. Esses devem ser específicos para que o anelamento ocorra apenas quando houver DNA de *T. cruzi*.

A descoberta que os minicírculos do kDNA em *T. cruzi* continham segmentos repetidos (conservados) e abundantes, denominados “mini-repeats”, fez com que estas moléculas pudessem se constituir em alvos ideais para o desenvolvimento de processos moleculares de detecção e tipagem deste parasito. Vários autores utilizam o kDNA para o diagnóstico da doença de Chagas, um exemplo são os *primers* 121 e 122 que amplificam um seguimento de 330 pb (BRITTO et al., 1993, 1995; WINCKER, et al., 1994(a); WINCKER, et al., 1994(b)). Esses *primers* foram desenhados com o objetivo de melhorar a sensibilidade da técnica para ser aplicada no diagnóstico da doença de Chagas de pacientes crônicos.

Por outro lado, existem estudos que utilizam *primers* específicos a regiões do DNA nuclear, por apresentar um maior número de cópias em relação ao kDNA do *T. cruzi*. Virreira et al. (2003) analisaram 6 pares de *primers* para região nuclear e dois pares para a região do kDNA e observaram que os *primers* TCZ1 e TCZ2, para região nuclear, apresentaram melhor performance em relação aos outros. Esses pares anelam a um alvo nuclear (188 pb) de uma região satélite repetitiva de 195 pb e que se dispõe em 120.000 cópias no genoma do tripanossomatídeo (MOSER, et al., 1989).

Apesar da intensa plasticidade genética observada entre as diferentes cepas e isolados do *T. cruzi*, os pares TCZ1 e TCZ2 apresentam elevada especificidade em detectar DNA de todas as cepas e clones do parasito. Este dado foi observado por Virreira et al. (2003), que mostraram resultados positivos de amplificação por PCR em todas as cepas de *T. cruzi* testadas, e ausência de amplificação quando foi utilizado DNA de outras espécies de tripanosomatídeos.

Kirchhoff et al. (1996) compararam a habilidade da PCR em detectar DNA do parasito no sangue de camundongos infectados com *T. cruzi* utilizando os *primers* TCZ1 e TCZ2, frente aos resultados de microscopia, e verificaram uma alta sensibilidade da PCR, a qual possibilitou a detecção do parasito 3,9 dias antes da microscopia. Virreira et al. (2003) avaliaram o diagnóstico da doença de Chagas congênita, através de PCR, utilizando os mesmos *primers*. A sensibilidade do sistema supracitado foi de 0,02 parasitos por ensaio e, com relação à especificidade, os *primers* foram capazes de amplificar todas as linhagens de *T. cruzi* sem amplificar de outras espécies. Assim, por apresentarem alta sensibilidade, alta especificidade e grande rapidez no diagnóstico, ambos os trabalhos aqui citados sugerem a PCR

como um método eficaz para o diagnóstico de indivíduos suspeitos de infecção chagásica.

2.3.3 Materiais biológicos para obtenção de DNA de *T. cruzi*

O *T. cruzi* infecta, preferencialmente, as células estriadas musculares e cardíacas, mas também pode ser identificado na medula óssea, na córnea, na bexiga ou no sangue periférico (BOCZKO, et al., 2005; CORRAL, et al., 1989, HERRERA et al., 2007). Contudo a quantidade de parasitos presentes na corrente sanguínea está relacionada com a fase da doença, e na maioria das vezes o diagnóstico só é realizado na fase crônica, que é caracterizada por apresentar uma baixa parasitemia, dificultando assim a detecção do parasito pelos testes parasitológicos convencionais.

Com o advento da PCR, a identificação de seqüências-alvo do *T. cruzi* em material biológico proveniente de indivíduos infectados na fase crônica da doença, e até mesmo em amostras degradadas tem sido demonstrada (ÁVILA et al., 1991; BRITTO et al., 1993; MARIN et al., 2002; YANG; ROTHMAN, 2004; WINCKER et al., 1994 (a)). A literatura relaciona diversos materiais biológicos que podem ser usados como fonte de obtenção de DNA de *T. cruzi*, incluindo tecidos em parafina (biopsias), que datam de mais de 40 anos. Através da análise desses materiais consegue-se relacionar o patógeno com as alterações encontradas em alguns órgãos. Por outro lado existem algumas desvantagens que dependem do método de fixação e do tipo de fixador utilizado para a conservação dessas amostras que podem causar a degradação do DNA, prejudicando assim a detecção do agente etiológico (BAREA et al., 2004; FERNANDES et al., 2004; MESQUITA et al., 2001).

A paleoparasitologia molecular é uma ferramenta nova que tem identificado infecções causadas por diversos microorganismos nos povos antepassados. A técnica de PCR possibilitou a amplificação de DNA de *T. cruzi* em amostras de múmias humanas com mais de 4000 anos, confirmando a antiguidade da doença de Chagas (FERREIRA et al., 2000; GUHL et al., 1997, 1999). Isto demonstra a eficiência dessa abordagem na identificação de DNA de *T. cruzi* em amostras arqueológicas que não passaram por processos químicos de conservação.

Comumente a amostra utilizada para amplificação do material genético do parasito pela PCR é o sangue total. Uma das dificuldades em inquéritos epidemiológicos é a coleta do material em áreas distantes dos laboratórios onde serão processadas e analisadas. Contudo, Ávila et al. (1991) desenvolveram uma técnica eficiente de preservação do sangue total para posterior utilização em PCR, misturando-o a uma solução de Guanidina-EDTA. Porém, esta metodologia acarreta aumento em mais uma etapa do processo, o que também gera um custo adicional à técnica de PCR. Além disso, este composto pode apresentar inibidores da PCR levando a uma redução da sensibilidade de detecção (KIRCHHOFF et al., 1996).

Um estudo preliminar para detectar DNA nuclear de *T. cruzi* através de PCR utilizando os *primers* TCZ1 e TCZ2, não demonstrou diferença significativa entre o uso de amostras de soro e sangue total, indicando, assim, a utilização de soro como amostra para o diagnóstico molecular da doença de Chagas (RUSSOMANDO et al., 1992).

De fato existe uma grande perspectiva para o diagnóstico molecular da infecção utilizando amostras de soro de pacientes chagásicos como amostra clínica. A utilização de soro sem tratamento prévio para sua preservação, como proposto por Russomando et al. (1992), seria de grande valia devido a uma considerável facilidade no manuseio, quando comparado ao sangue total. Além disso, haveria a facilidade de utilizar uma mesma amostra coletada para diagnóstico sorológico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para desenvolver uma PCR qualitativa capaz de detectar DNA de *T. cruzi* a partir de amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos foram necessárias algumas etapas que serão descritas a seguir.

Inicialmente à padronização foi realizada uma etapa de cultura de parasitos para obtenção de DNA de *T. cruzi*, sendo esse utilizado durante todo o primeiro momento da padronização.

Na padronização, foi realizada a reprodução de protocolos já descritos na literatura, que trabalhassem com *primers* nucleares (TCZ1 e TCZ2) e que também utilizassem amostras de soro de pacientes chagásicos. Dentre os vários protocolos de PCR encontrados na revisão de literatura, foram escolhidos os desenvolvidos por Moser et al. (1989) e Russomando et al. (1992). Sendo os primeiros autores responsáveis pelo desenho dos *primers* nucleares, escolhidos na metodologia desse trabalho, e os segundos por terem utilizado amostras de soro de pacientes chagásicos respectivamente.

Após a escolha do protocolo, foram realizados alguns ajustes dos reagentes e das condições de ciclagem, a fim de que a técnica alcançasse o objetivo do trabalho. Primeiramente, foram alteradas as concentrações de *primers* e da enzima Taq polimerase e o número de ciclos. No segundo momento, foi aplicado o DNA obtido de amostras clínicas de sangue e soro obtidas de pacientes chagásicos crônicos, os quais foram inicialmente selecionados por dois testes ELISA (BRAISL, 2005). As amostras clínicas foram extraídas após escolha do melhor protocolo de extração, como descrito no item 3.2.2 dos materiais e métodos. Vale resaltar que em todo primeiro momento foram utilizadas amostras de DNA obtido de cultura de células de *T. cruzi*.

A análise das amostras frente ao protocolo padronizado necessitou de alguns ajustes tanto em relação às condições de ciclagem, como também nas concentrações dos reagentes empregados. Desta forma, foi realizada a otimização da PCR para seu uso clínico com amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos crônicos. Para isso foram analisadas a temperatura de anelamento, a quantidade de DNA alvo e de *primers* a partir de amostras reconstituídas de sangue e soro de indivíduo não chagásico.

Por fim, após a otimização da técnica, foi possível aplicar a PCR para diagnosticar as amostras obtidas dos participantes envolvidos no trabalho. Para identificar possível inibição da técnica foram realizados os ensaios de PCR para o gene β -globina humana e da PCR com outros *primers* nucleares satélites.

A partir dos resultados obtidos foi possível calcular a sensibilidade e a especificidade da técnica, como também a concordância entre os resultados (índice Kappa), e desta forma indicar a possível utilização do soro como amostra clínica no diagnóstico molecular da doença de Chagas.

3.1 Obtenção de tripomastigotas

Alíquotas descongeladas de células Vero foram adicionadas a garrafas de cultura (25 cm²) contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após formação da monocamada de células, 5×10^6 tripomastigotas/mL obtidos de camundongos infectados com a cepa Y foram adicionados às garrafas de cultura. A multiplicação do *T. cruzi* no interior da célula foi acompanhada diariamente até o rompimento das células, quando então amostras contendo tripomastigotas presentes no sobrenadante foram coletadas. Os tripomastigotas foram lavados com PBS por centrifugação (1000 X *g* por 10 min à temperatura ambiente) e em seguida foram quantificados em câmara de Neubauer. Alíquotas contendo mais de 10^7 tripomastigotas/mL foram criopreservadas a -70°C.

3.1.1 Extração de DNA de *T. cruzi*

As alíquotas contendo as formas tripomastigotas criopreservadas foram utilizadas para extração de DNA por fenol-clorofórmio e posteriormente pelo *kit* da marca Qiagen® de acordo com o item 3.2.2. Após a eluição do material genético com 50 μ L de Tris EDTA (TE) a 0,1%, o volume obtido foi armazenado em microtubos autoclavados e mantido a - 20° C para posterior utilização nos ensaios de PCR.

3.1.2 Dosagens do DNA extraído

O DNA de *T. cruzi* extraído foi analisado quanto a sua concentração através do espectrofotômetro ULTROSPEC 3000 (Pharmacia Biothec) utilizando comprimentos de onda na faixa de 260 a 280 nm.

3.2 Padronização da PCR

Para essa etapa foi utilizado DNA de *T. cruzi* obtido de células de cultura e extraído conforme o item 3.1.1.

3.2.1 Condições de ciclagem e reagentes

a) PROTOCOLOS

A ciclagem, assim como as concentrações dos reagentes foram reproduzidas de protocolos já estabelecidos na literatura, como os descritos por Moser et al. (1989) e Russomando et al. (1992). O termociclador utilizado foi o *mastercycler gradient* da (Eppendorf®), e a quantidade de DNA extraído de tripomastigotas utilizada partiu de diluições seriadas: 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 1 pg, 0,1 pg, 0,01 pg, 1,5 fg, 1 fg, 0,5 fg, 0,25 fg com a finalidade de obtenção de uma curva de limite de detecção.

I. Reprodução da ciclagem segundo o protocolo de Moser et al. (1989):

Foi utilizado um volume final de 50 μ L de reação contendo 5 U (0,1 U/ μ L) de Taq polimerase platinum, em tampão 1X contendo 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de

cada dNTP e 50 pmol (1 pmol/ μ L) de cada *primer* (TCZ1 – 5' CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT e TCZ2 – 5' CCTCCAA-GCAGCGGATAGTTCAGG), todos os reagentes da marca Invitrogen[®]. A ciclagem de 25 ciclos foi empregada para desnaturação, anelamento e extensão segundo a Tabela 1.

Tabela 1 – Representação da ciclagem de Moser

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Etapas
94	5	
94	½	
55	½	
55	1	
72	½	
72	1,5	
94	½	} 25 ciclos
55	½	
72	½	
72	3	
20	----	Temperatura hold

Fonte: Adaptado de Moser et al. (1989).

II. Reprodução da ciclagem segundo o protocolo de Russomando et al. (1992):

Foi utilizado um volume final de 100 μ L contendo 5 U (0,05 U/ μ L) de Taq polimerase platinum, em tampão 1X contendo 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP e 100 pmol (1 pmol/ μ L) de cada primer todos da marca Invitrogen[®]. A ciclagem de 25 ciclos foi empregada para desnaturação, anelamento e extensão segundo a Tabela 2.

Tabela 2 - Representação da ciclagem de Russomando

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Etapas
95	5	} 25 ciclos
95	1	
53	1 ½	
73	2	
73	5	
20	----	Temperatura hold

Fonte: Adaptado de Russomando et al. (1992).

b) CONCENTRAÇÃO DE PRIMERS E DA ENZIMA TAQ POLIMERASE E ESPECIFICIDADE DO ANELAMENTO

Após escolhida a melhor ciclagem, foi analisada a quantidade ideal de *primers*, TCZ1 – 5' CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT e TCZ2 – 5' CCTCCAA-GCAGCGGATAGTTCAGG (Invitrogen®), para que não ocorresse a formação excessiva de dímeros. Para isso, foi utilizada a concentração de 10 pmol/μL para cada *primer*, sendo adicionado 2,5 μL (25 pmol por reação) e 5 μL (50 pmol por reação) de cada *primer* na ciclagem de Moser et al. (1989) em reações distintas com volume final de 50μL. Além disso, esses ensaios foram avaliados com a quantidade de 2,5 U de Taq Polimerase.

Para avaliar a especificidade de anelamento dos *primers* foi realizado um ensaio de PCR utilizando amostras de DNA de *Leishmania chagasi* e *L. brasiliensis* nas seguintes quantidades: 5 ng; 0,05 ng; 0,005 ng; 50 fg; 5 fg.

c) NÚMERO DE CICLOS

A determinação da quantidade de ciclos é importante ser estabelecida para melhorar a visualização da banda específica, ou seja, a sensibilidade da técnica. Portanto, para a padronização da PCR foram testados 35 e 40 ciclos para as temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão com as condições de reagentes padronizadas.

d) DETECÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS EM GEL DE AGAROSE

Dez microlitros de produto da PCR foram aplicados em gel de agarose (BioAgency[®]) a 2% em tampão Tris Acetato EDTA (TAE) 1X contendo brometo de etídeo (10 mg/mL). O gel foi submetido à 80 volts por 2 horas. Após a corrida eletroforética, os fragmentos foram visualizados através da exposição à luz ultravioleta com auxílio do transluminador UV (modelo 60648 da marca Cole Parmer[®]) e fotodocumentados utilizando o equipamento *Gel Logic 100 Imaging System* da Kodak[®].

Para cada corrida eletroforética foi adicionado um padrão molecular (ladder, Invitrogen[®]) com pesos moleculares conhecidos. O DNA ladder 100 pb consiste de 15 fragmentos entre 100 e 1500 pb em múltiplos de 100 pb e de um fragmento adicional de 2072 pb.

3.2.2 Tipos de extração

A escolha do método empregado para isolar o DNA é de suma importância para a padronização, pois a integralidade do material purificado pode influenciar no resultado das técnicas, como na PCR. Foi comparada a eficácia de três métodos na obtenção de DNA de *Trypanosoma cruzi* em soro de pacientes chagásicos crônicos. Para isso, sete amostras de soro de pacientes sabidamente chagásicos foram extraídas através da técnica do fenol-clorofórmio e de dois diferentes *kits* comerciais, o Illustra (GE Healthcare[®]) e o *kit* Mini Blood Qiam (Qiagen[®]).

Para os *kits*, foram utilizados 200 µL de soro segundo recomendações dos fabricantes. Para o procedimento do fenol-clorofórmio *in-house* foi utilizado 500 µL de soro. Resumidamente o protocolo seguiu as seguintes etapas: para lisar as células foram adicionados 100 µL de solução de lise (NaCl 100 mM; TrisCl 10 mM, pH 8; SDS 0,5%; proteinase K 20 mg/ml) e 3 µL de proteinase K ao soro, essa solução foi incubada em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Após o banho-maria, os tubos contendo a solução lisada foram mantidas em nitrogênio líquido até a

solidificação do material. Em seguida, as amostras foram retiradas do nitrogênio líquido e mantidas à temperatura ambiente. Após as amostras se liquefazerem novamente, foi adicionado fenol-clorofórmio na concentração de 1:1 e o material centrifugado a 5500 X g por 3 minutos. O sobrenadante foi separado e adicionado, novamente, o fenol-clorofórmio (1:1) e em seguida centrifugado. O sobrenadante foi aliqotado e, a ele, adicionado clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) na concentração de 1:1, repete-se a centrifugação por 3 minutos a 5500 X g. O sobrenadante foi separado e acrescentado álcool isopropílico na concentração de 1:1. Em seguida o material foi centrifugado a 2000 X g por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o material genético foi seco a temperatura ambiente por 30 minutos. Por fim, foram adicionados 50 μ L de TE a 0,1% para ressuspender o DNA (Figura 4).

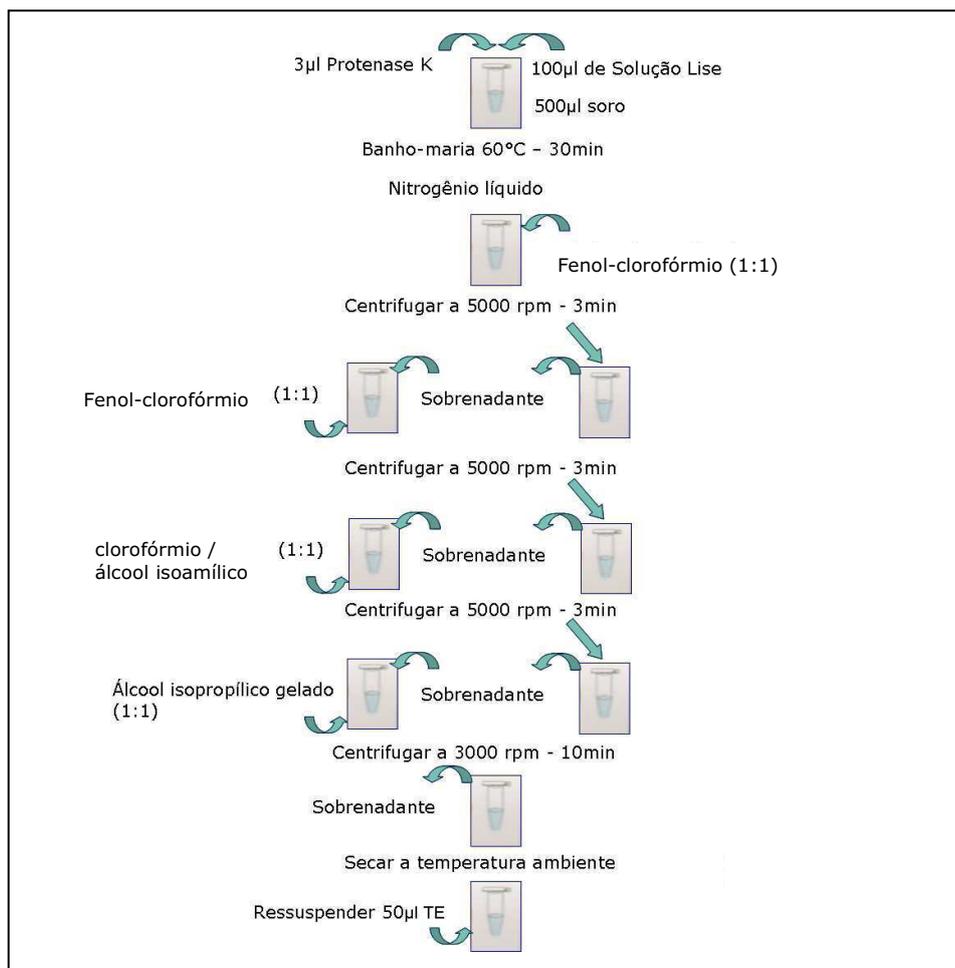


Figura 4. Protocolo da extração de DNA de amostras de soro através do fenol-clorofórmio *in house*. Fonte: Elaboração própria.

Amostras de soro de indivíduos não chagásicos foram selecionadas como controle negativo da reação. As amostras foram dosadas para analisar a quantidade de DNA recuperado. As condições da PCR foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Moser et al. (1989).

3.3 Definição da população de estudo

3.3.1 Pacientes

Sessenta e cinco pacientes chagásicos foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) da Universidade de Pernambuco (UPE), através de uma amostragem não-probabilística, do tipo por conveniência, no período de março/2008 a julho/2009. Também foram selecionados trinta e cinco indivíduos não chagásicos, sendo 9 acompanhantes dos pacientes de área endêmica e 26 de área não endêmica (região metropolitana).

3.3.1.1 Coleta das Amostras

De cada indivíduo envolvido no estudo foram coletados 5 mL de sangue periférico pelo sistema a vácuo (Vacutainer®) para obtenção de soro, além de outros 5 mL que foram coletados em tubos contendo EDTA para obtenção de sangue total. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C para posterior extração de DNA, ou serem imediatamente utilizadas. Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ).

3.3.1.2 Questões éticas

Todos os indivíduos chagásicos que participaram do estudo foram avaliados pela médica responsável (Dra. Glória de Melo) do ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da UPE, preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A), enquanto que os indivíduos não chagásicos assinaram o TCLE para os indivíduos não chagásicos (Apêndice B). Todos os participantes responderam o questionário clínico-epidemiológico (Apêndice C). Todas as abordagens do trabalho foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisas do CPqAM/FIOCRUZ-PE sob o número 96/07, registro no CAAE 0096.0.095.000-07 (Anexo A).

3.3.1.3 Diagnóstico Sorológico

Para confirmação do diagnóstico sorológico foram utilizados 2 testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas distintas: ELISA-convencional da marca ABBOT (CHAGAS TEST ELISA III) e o ELISA-recombinante da marca WAMA Diagnóstica (Imuno-Elisa CHAGAS). O ELISA-convencional é realizado em placas sensibilizadas com extrato total das cepas de *T. cruzi* Tulahuén e Mn⁶ que forma um complexo antígeno-anticorpo com a amostra analisada. O ELISA-recombinante difere do ELISA-convencional por utilizar antígenos recombinantes específicos do *T. cruzi* para a sensibilização da placa.

Quanto ao resultado da sorologia, uma amostra foi considerada reagente quando sua absorbância foi maior que o valor do *cut-off*, e não reagente quando sua absorbância foi menor que este valor, segundo as instruções dos fabricantes. Os ensaios foram realizados no laboratório de Imunoparasitologia do departamento de Imunologia do CpqAM/FIOCRUZ.

3.3.1.4 Classificação e procedência dos pacientes

As amostras chagásicas do estudo foram agrupadas de acordo com a faixa etária, sexo e formas clínicas da doença. Os pacientes chagásicos também foram analisados de acordo com o local de nascimento.

3.3.1.5 Extração de DNA das amostras clínicas

Após a avaliação e escolha do método de extração frente ao item 3.2.2, o DNA foi extraído das amostras de soro e sangue de pacientes chagásicos crônicos e dos indivíduos não chagásicos. O DNA recuperado de sangue foi eluído em um volume de 80 μL , e em 50 μL no caso das amostras de soro. O material foi armazenado à - 20° C para posterior utilização na PCR.

3.3.1.6 Dosagem de DNA das amostras clínicas

Para avaliar a concentração do DNA, o material obtido de amostras de sangue e soro foi analisado quanto a sua concentração através de espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda em 260nm/280nm. Para isso, 2 μL de cada amostra foram diluídos a 1:30 em TE 0,1%. A concentração final ($\mu\text{g/mL}$) obtida após leitura foi multiplicada pelo fator de diluição.

3.3.2 Otimização da técnica de PCR em amostras clínicas

Para essa etapa foram ajustadas as concentrações de *primers* e DNA, e selecionada a temperatura de anelamento ideal.

a) PCR EM AMOSTRAS DE SANGUE

3.3.2.1 Gradiente de temperaturas de anelamento

Foi realizado um ensaio de PCR gradiente utilizando amostras contendo DNA obtido de *T. cruzi* e DNA obtido de amostra de sangue de indivíduo não chagásico, com a finalidade de determinar a temperatura de anelamento que favorecesse uma melhora na especificidade dos *primers* utilizados. Foi selecionada uma faixa de temperatura que variou de 55,7°C a 57,8°C.

3.3.2.2 Quantidade de DNA alvo

Também foram testadas diferentes concentrações de DNA obtido a partir de amostras de sangue de dois pacientes confirmadamente chagásicos, com a finalidade de verificar se houve alteração no perfil de produtos gerados pela amplificação por PCR.

b) PCR EM AMOSTRAS DE SORO

3.3.2.3 Quantidade de *primers*

Para avaliar a eficácia do ensaio de PCR utilizando DNA obtido de amostras de soro de cinco pacientes chagásicos, foram testadas diferentes quantidades de *primers*: 20 pmol, 15 pmol e 10 pmol por reação (50 µL), mantendo as concentrações dos demais compostos da reação.

3.3.3 Limite de detecção da PCR em amostras reconstituídas

Para a determinação do limite de detecção do ensaio da PCR, foram realizados experimentos de reconstituição empregando-se amostras de soro e sangue de indivíduo não chagásico contendo concentrações decrescentes de células de *T. cruzi*, a partir do fator 10 iniciando com 10^3 e finalizando com 0 parasitos, sendo a amostra tanto de sangue quanto de soro, o diluente. O DNA das amostras reconstituídas foi recuperado por extração com o método escolhido após a avaliação do item 3.2.2.

3.4 Aplicação da PCR para a detecção de DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostras de sangue e de soro

Após a padronização da PCR com amostras clínicas reconstituídas, foi realizada uma avaliação do desempenho da técnica para o diagnóstico de amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos e de indivíduos não chagásicos. Os ensaios de PCR foram realizados em volume final de 50 μL , nas seguintes condições de reação: 20 pmol (0,4 pmol/ μL) de cada *primers* TCZ1 e TCZ2, 1X tampão da Taq Polimerase contendo 1,5 mM de MgCl_2 , 2,5 U (0,05 U/ μL) da enzima Taq Polimerase Platinum (concentração estoque 5 U/ μL) (Invitrogen), 200 μM de dNTPs, 5 μL de DNA de sangue ou 10 μL de DNA de soro. A ciclagem utilizada foi realizada segundo Moser et al. (1989) com alterações quanto à quantidade de ciclos e temperatura de anelamento, como demonstrado na seção de resultados.

Para cada ensaio de PCR foi adicionada uma amostra soronegativa para a infecção chagásica, além de um controle branco (amostra contendo todos os reagentes e água ao invés do DNA), e um controle positivo (0,1 pg de DNA genômico de *T. cruzi*). Todas as pipetas foram separadas conforme a sua utilidade, como por exemplo, os ambientes para aplicação do DNA e para preparação da mistura de reação, a fim de se evitar riscos de contaminação entre amostras e por produtos previamente amplificados (amplicons).

3.4.1 Ensaios de PCR para o gene da β -globina humana

Todas as amostras que apresentaram resultados negativos na amplificação de DNA de *T. cruzi* utilizando os primers TCZ1 e TCZ2, foram testadas através de outro ensaio de PCR utilizando iniciadores que são específicos para a seqüência humana da β -globina, PC03 (5' ACACAACTGTGTTCACTAGC 3') e PC04 (5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3'), conforme descrito em WINCKER et al. (1994a). Este ensaio tem a finalidade de identificar a presença de possíveis inibidores da enzima Taq Polimerase, além de possibilitar avaliar a integridade do DNA purificado, ou seja, analisar a qualidade do material que está sendo amplificado.

As condições de ciclagem e reagentes foram as mesmas utilizadas para as amostras de sangue e soro quando utilizado os pares TCZ1 e TCZ2. As amostras que apresentaram resultados negativos nos ensaios de β -globina foram descartadas, e o DNA dessas amostras foi extraído novamente a partir de novas alíquotas de material clínico (sangue ou soro) para serem reavaliadas.

3.4.2 Utilização de novos primers para as seqüências nucleares satélites de *T. cruzi*

Após os ensaios com amostras clínicas de pacientes chagásicos crônicos soropositivos com os *primers* TCZ1 e TCZ2 (MOSER et al., 1989), as amostras que geraram resultados negativos nos ensaios, foram novamente testadas, dessa vez empregando outro conjunto de *primers* (*primer* 1: TCGGCTGATCGTTTTTCGAG; *primer* 2: GGGTGGTAAGTGTAGCCT) para as mesmas seqüências-alvo (nuclear satélite), os quais amplificam um fragmento menor de 76 pb. A reação ocorreu em um volume final de 50 μ L, contendo: 20 pmol de cada *primer* (0,4 pmol/ μ L), 1 X tampão da Taq Polimerase, 4 mM de MgCl₂, 0,25 μ L da enzima Taq Polimerase Platinum (5U/ μ L), todos da marca Invitrogen[®], 0,2 mM de dNTPs, 10 μ L de DNA de sangue ou soro. A ciclagem para realização desse ensaio seguiu o protocolo presente na Tabela 3.

Tabela 3 - Representação da ciclagem com os *primers* modificados da região satélite

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Etapas
94	3	
98	1	} 2 ciclos
58	2	
94	1	} 38 ciclos
58	1	
72	10	
4	----	Temperatura hold

Fonte: Elaboração própria.

3.5 Análises estatísticas dos dados

3.5.1 Teste de concordância

Os resultados dos ensaios da PCR foram analisados por duas pessoas que desconheciam a reatividade das amostras. Estas analisaram cada gel fotodocumentado separadamente, avaliando a presença ou ausência do fragmento de DNA específico de *T. cruzi*, ou seja, a análise de concordância entre os observadores foi baseada na avaliação do indicador *kappa* (*k*), segundo Andrade e Zicher (1997) (Tabela 4).

Tabela 4 – Escala de concordância do indicador *Kappa*

<i>Kappa</i>	Concordância
<0,00	Nenhum
0,00 – 0,20	Fraco
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Fonte: Andrade e Zicher (1997)

3.5.2 Sensibilidade e especificidade

A sensibilidade e especificidade dos ensaios de PCR foram estimadas de acordo com Ferreira e Ávila (2001), utilizando uma tabela de dupla entrada relacionando o diagnóstico da doença e o resultado do teste (Tabela 5).

Tabela 5 - Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.

TESTES	DOENÇA – Diagnóstico verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	Positivos verdadeiros A	Positivos falsos B
Negativo	Negativos falsos C	Negativos verdadeiros D

Fonte: Ferreira e Ávila (2001).

A sensibilidade do teste foi calculada pela percentagem de resultados positivos entre os indivíduos sabidamente chagásicos e a especificidade, pela percentagem de resultados negativos, entre indivíduos não chagásicos. Esses parâmetros foram analisados de acordo com nível de significância de 95%.

3.5.3 Análise estatística

Para análise comparativa entre as variáveis qualitativas foi aplicado o teste *Kappa*, e para avaliação da sensibilidade e especificidade da PCR foi empregado o teste de *two proportion* do software *MINITAB 15*, e para análise dos dados de formas clínicas, idade e sexo foram utilizados os softwares R - 2.9.0 e EPI 6. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da PCR

4.1.1 Condições de ciclagem e reagentes

a) PROTOCOLOS

Inicialmente, foram reproduzidas as condições de PCR previamente descritas por Moser et al. (1989) e Russomando et al. (1992). O DNA purificado de 10^8 tripomastigotas de *T. cruzi*, contendo $197,4 \text{ ng}/\mu\text{L}$, foi serialmente diluído em concentrações que variaram de 10 ng a 0,25 fg de DNA e utilizado para a determinação do limite de detecção da PCR. Após corrida eletroforética dos produtos amplificados, o fragmento de 188 pb (seta em vermelho) correspondente às seqüências satélites repetitivas presentes em torno de 120.000 cópias no genoma nuclear de *T. cruzi*, pôde ser detectado até a diluição correspondente a 0,1 pg de DNA, utilizando o protocolo de Moser et al. (1989) (Figura 5), e até 1 pg quando foi empregado o protocolo de Russomando et al. (1992) (Figura 6).

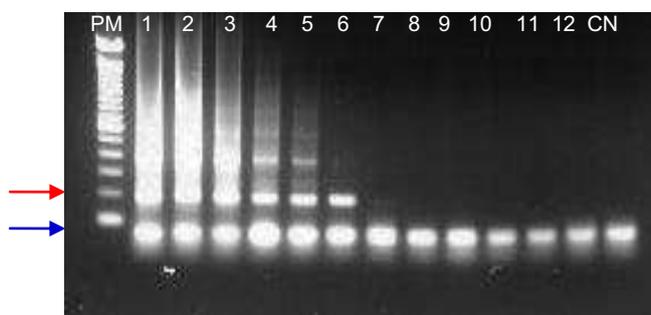


Figura 5. Fragmentos amplificados do gene de *T. cruzi* pela PCR limite de detecção realizada segundo protocolo de Moser et al. (1989). Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 - 10ng; 2 - 5 ng; 3 - 1ng; 4 - 0,1ng; 5 - 0,01ng; 6 - 1pg; 7 - 0,1pg; 8 - 0,01pg; 9 - 1,5fg; 10 - 1fg; 11 - 0,5fg; 12 - 0,25fg de DNA de *T. cruzi* em diluições seriadas; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). PM - Peso Molecular – 1000pb; CN - Controle Negativo contém todos os reagentes da PCR sem DNA de *T. cruzi*. Seta em azul= dímeros de primers

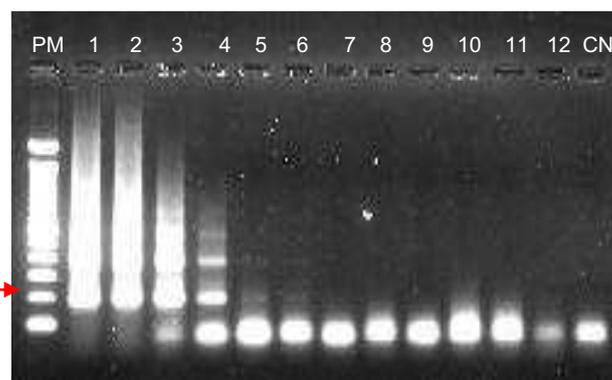


Figura 6. Fragmentos amplificados do gene de *T. cruzi* pela PCR limite de detecção realizada segundo protocolo de Russomando et al. (1989). Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 - 10ng; 2 - 5 ng; 3 - 1ng; 4 - 0,1ng; 5 - 0,01ng; 6 - 1pg; 7 - 0,1pg; 8 - 0,01pg; 9 - 1,5fg; 10 - 1fg; 11 - 0,5fg; 12 - 0,25fg de DNA de *T. cruzi* em diluições seriadas; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). PM - Peso Molecular – 1000pb; CN - Controle Negativo contém todos os reagentes da PCR sem DNA de *T. cruzi*. Seta em azul= dímeros de primers

b) CONCENTRAÇÃO DE *PRIMERS* E DA ENZIMA TAQ POLIMERASE E ESPECIFICIDADE DO ANELAMENTO

Dada à sensibilidade 10X maior observada com o protocolo de Moser et al. (1989) em relação ao de Russomando et al. (1992), utilizando concentrações decrescentes de DNA de *T. cruzi*, este método foi utilizado como referência para os ensaios de otimização das concentrações de reagentes utilizados na PCR.

A Figura 7 mostra o resultado do teste da concentração de *primers* baseado no protocolo de Moser et al. (1989), utilizando 25 ciclos de amplificação e 2,5 U (0,05 U/ μ L) de Taq polimerase. Obteve-se uma detecção mais refinada quando utilizado 25 pmol de cada *primer* por reação, alcançando um limite de detecção de 0,01 pg ou 10 fg de DNA (Figura 7A), enquanto que utilizando 50 pmol por reação, o limite foi 10X menor, 0,1 pg (Figura 7B).

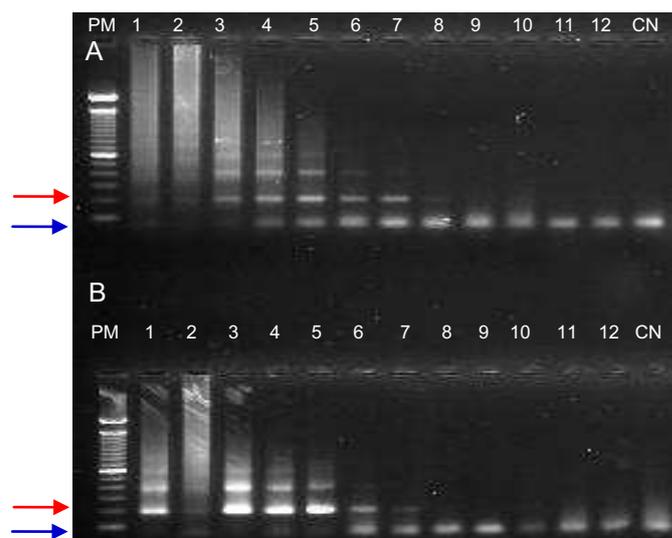


Figura 7. Fragmentos da amplificação do gene de *T. cruzi* pela PCR limite de detecção segundo ciclagem de Moser et al., (1989) utilizando 25 pmol (A) e 50 pmol (B) de cada *primer*. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1-10ng; 2- 5 ng; 3- 1ng; 4- 0,1ng; 5- 0,01ng; 6- 1pg; 7- 0,1pg; 8- 0,01pg; 9- 1,5fg; 10- 1fg; 11- 0,5fg; 12- 0,25fg de DNA de *T. cruzi* em diluição seriada; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). PM- Peso Molecular – 1000 pb; CN - Controle Negativo contém todos os reagentes sem DNA. Seta em azul= dímeros de *primers*, Seta em vermelho= fragmento de 188 pb

Para avaliar a especificidade dos *primers* descritos por Moser et al. (1989) foram utilizadas diluições seriadas de DNA isolado de *Leishmania chagasi* e *Leishmania brasiliensis*. Os resultados corroboram dados da literatura (MOSER et

al., 1989; VIERREIRA et al., 2003), ou seja, não houve nenhuma amplificação com o DNA de *Leishmania sp*, mostrando que os *primers* são específicos para *T. cruzi*.

c) NÚMEROS DE CICLOS

O número de ciclos para as temperaturas de desnaturação, anelamento, e extensão foi avaliado. Alterações no protocolo de Moser et al. (1989) foram realizadas, aumentando de 25 para 35 e 40 ciclos de amplificação. Ambas as ciclagens forneceram o mesmo limite de detecção segundo os resultados dos experimentos de padronização da técnica (0,01 pg ou 10 fg de DNA) (Figuras 8, linha 5 e Figura 9, linha 5). Apesar deste resultado similar, optou-se por realizar 35 ciclos de amplificação nos ensaios diagnósticos com amostras clínicas.

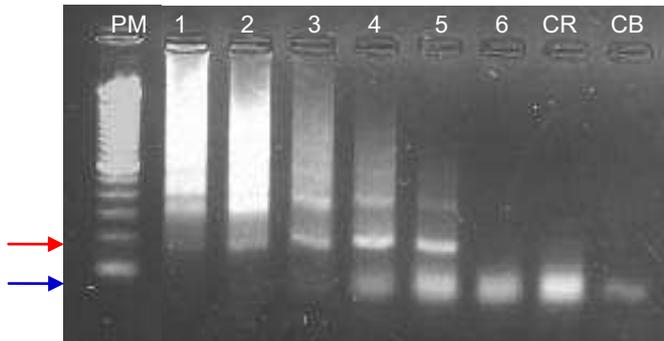


Figura 8. Fragmentos amplificados do gene de *T. cruzi* pela PCR utilizando 35 ciclos. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1- 0,1 ng; 2- 10 pg; 3- 1 pg; 4- 0,1 pg; 5- 0,01 pg; 6- 1,5 fg de DNA de *T. cruzi* em diluição seriada; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). PM – Peso molecular – 1000 pb; CR- Controle da reação contém apenas reagentes da PCR sem DNA de *T. cruzi* e CB- Controle branco, contém todos os reagentes e água. Seta em azul= dímeros de *primers*, seta em vermelho= fragmento de 188 pb.



Figura 9. Fragmentos amplificados do gene de *T. cruzi* pela PCR utilizando 40 ciclos. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1- 0,1 ng; 2- 10 pg; 3- 1 pg; 4- 0,1 pg; 5- 0,01 pg; 6- 1,5 fg de DNA de *T. cruzi* em diluição seriada; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). PM – Peso molecular – 1000 pb; CR- Controle da reação contém apenas reagentes da PCR sem DNA de *T. cruzi* e CB- Controle branco, contém todos os reagentes e água. Seta em azul= dímeros de *primers*, seta em vermelho= fragmento de 188 pb.

4.1.2 Tipos de extração

O isolamento de DNA de tecidos e amostras é essencial na prática da biologia molecular. É uma fase importante e que necessita de técnicas capazes de extrair com qualidade uma boa quantidade de DNA. A qualidade, a pureza e a integridade do DNA dependem de muitos fatores e têm uma grande influência no resultado das

técnicas, como na PCR. Dentre as sete amostras de sororo de pacientes chagásicos crônicos extraídas com o fenol-clorofórmio e aplicadas na técnica padronizada, apenas 28,6% das amostras apresentaram amplificação do material. Enquanto que as amostras cujo DNA foi extraído através de dois *kits* comerciais que utilizam uma membrana de sílica, verificou-se que o *kit* da marca GE Healthcare® obteve uma maior quantidade de DNA em relação ao *kit* da marca Qiagen®, porém, o que apresentou melhores resultados, com 71,4% das amostras amplificadas, foi o segundo (Tabela 6 e Figura 10).

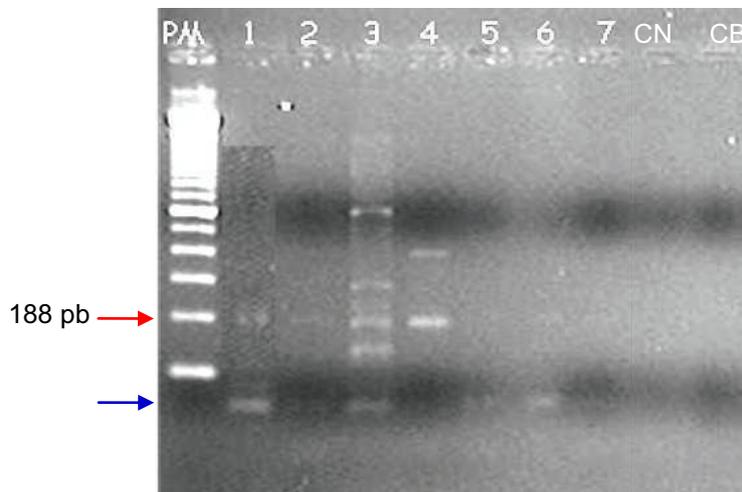


Figura 10. Fragmentos amplificados do gene de *T. cruzi* pela PCR aplicando DNA obtido de amostras de sororo de pacientes chagásicos extraídas com o *kit* da marca Qiagen®. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 – HUOC 193 2- HUOC 194; 3- HUOC 195; 4 - HUOC 196; 5 - HUOC 200; 6 - HUOC 201; 7 -HUOC 203; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). PM – Peso Molecular -1000 pb; CN – Controle negativo, DNA de amostra de sororo de indivíduo não chagásico; CB –Controle branco contém todos os reagentes e água . Seta em azul= dímeros de *primers*, Seta em vermelho= fragmento de 188 pb. Positivos = linhas 1, 2, 3, 4 e 6.

Tabela 6. Resultados das PCR utilizando DNA de amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos obtido através de diferentes métodos de extração versus a quantidade de DNA purificado (ng)

Amostras (HUOC)	Qiagen®	DNA na reação (ng)	Illustra®	DNA na reação (ng)	Fenol-clorofórmio	DNA na reação (ng)
193	POS	35	NEG	306,25	POS	385
194	POS	49	NEG	358,75	NEG	266
195	POS	56	NEG	428,75	NEG	486,5
196	POS	42	NEG	437,5	POS	360,5
200	NEG	35	NEG	647,5	NEG	59,5
201	POS	56	POS	411,25	NEG	262,5
203	NEG	63	NEG	393,75	NEG	49

Fonte: Elaboração própria. Nota: POS – Positivo; NEG - Negativo

4.2 População de estudo

4.2.1 Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes

A triagem sorológica realizada no período de março de 2008 a julho de 2009 possibilitou classificar os 100 indivíduos participantes do estudo em 65 pacientes chagásicos crônicos e 35 indivíduos não chagásicos. Através do questionário clínico-epidemiológico, os participantes foram classificados de acordo com a faixa etária, quadro clínico em que se encontram e a naturalidade.

Dentre os pacientes chagásicos (65), 55,4% (36) possuíam faixa etária de 20 a 59 anos e 44,6% (29) correspondentes a faixa etária acima de 60 anos, sendo 60% (39) do sexo feminino. Ocorreu predominância da forma cardíaca (60%) entre os portadores da infecção pelo *T. cruzi* (Tabela 7).

Tabela 7 - Formas clínicas dos pacientes chagásicos estudados

Formas clínicas	Número de pacientes (%)	Faixa etária	
		20 a 59 anos	Acima de 60 anos
Digestiva	5 (7,69%)	4	1
Cardíaca	39 (60%)	19	20
Indeterminada	9 (13,85%)	7	2
Mista	10 (15,38%)	5	5
Desconhecido	2 (3,08%)	1	1
TOTAL	65	36	29

Fonte: Elaboração própria.

Dos 65 pacientes chagásicos, 16 (25%) eram provenientes da microrregião da Mata Setentrional, sendo nove de estados vizinhos a Pernambuco, destes três eram provenientes da Paraíba.

4.2.2 Dosagem de DNA das amostras clínicas extraídas pelo kit Qiagen®

Os resultados mostraram que as amostras de sangue total, após extração e dosagem de DNA, continham maior quantidade de ácidos nucleicos purificados (44,75 ng/ μ L) em relação às amostras de soro (média da concentração = 27,08 ng/ μ L).

4.2.3 Otimização da técnica de PCR com amostras clínicas

Os primeiros ensaios empregando DNA obtido de amostras de sangue de indivíduos soropositivos apresentaram um perfil de bandas mais complexo, contendo fragmentos de três tamanhos distintos (setas vermelhas), de aproximadamente 120 pb, 300 pb e 600 pb (Figura 11). Sendo o fragmento de 188 pb não observado nos ensaios. Desta forma, foi necessário otimizar a técnica de PCR com as amostras clínicas para posterior realização do diagnóstico.

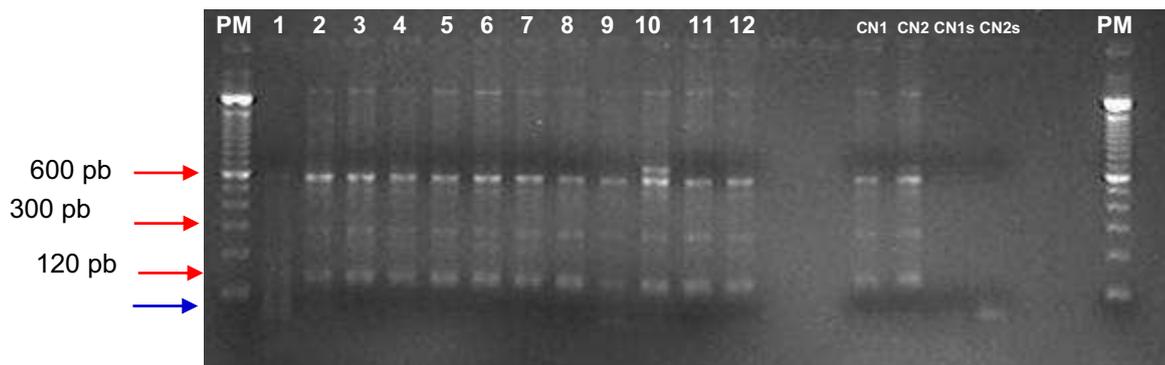


Figura 11. Perfil de fragmentos amplificados pela PCR com DNA obtido de amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: PM – Peso molecular; 1 – HUOC 193 2- HUOC 194; 3- HUOC 195; 4 - HUOC 196; 5 - HUOC 200; 6 - HUOC 201; 7 -HUOC 202; 8 -HUOC 203; 9 - HUOC 205; 10 - HUOC 209; 11 - HUOC 210; 12 - HUOC 211; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). PM – Peso Molecular – 1000 pb; CN1 e CN2 – Controles negativos em duplicata contém DNA de amostra de sangue de indivíduo não chagásico; CN1s e CN2s – Controles negativos em duplicata contém DNA de amostra de soro de indivíduo não chagásico. Setas vermelhas indicam o tamanho dos fragmentos visualizados no gel de agarose. Seta em azul= dímeros de *primers*. Seta em vermelho= fragmentos de aproximadamente 120 pb, 300 pb e 600 pb

4.2.3.1 PCR em amostras de Sangue

Essa secção aborda a otimização da técnica de PCR a partir da utilização de DNA obtido de amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos e de indivíduos não chagásicos.

4.2.3.1.1 Gradiente de temperaturas de anelamento

De acordo com a literatura, torna-se necessário estabelecer a temperatura ótima de anelamento dos *primers* com a seqüência alvo, a fim de gerar um ensaio de PCR específico e garantir assim, a credibilidade do teste diagnóstico a ser aplicado nas amostras de soro e sangue de indivíduos chagásicos e não-chagásicos. Para tal, na tentativa de melhorar a especificidade de anelamento empregando amostras clínicas, foi realizado um ensaio de PCR com gradiente de temperaturas a partir de amostras de sangue de indivíduos não chagásico (soronegativo), as quais foram misturadas com 0,1 pg de DNA de *T. cruzi* (Figura

12). A temperatura que apresentou melhor desempenho ficou entre 55,7°C e 56,5°C, sendo escolhida a temperatura de 56°C.

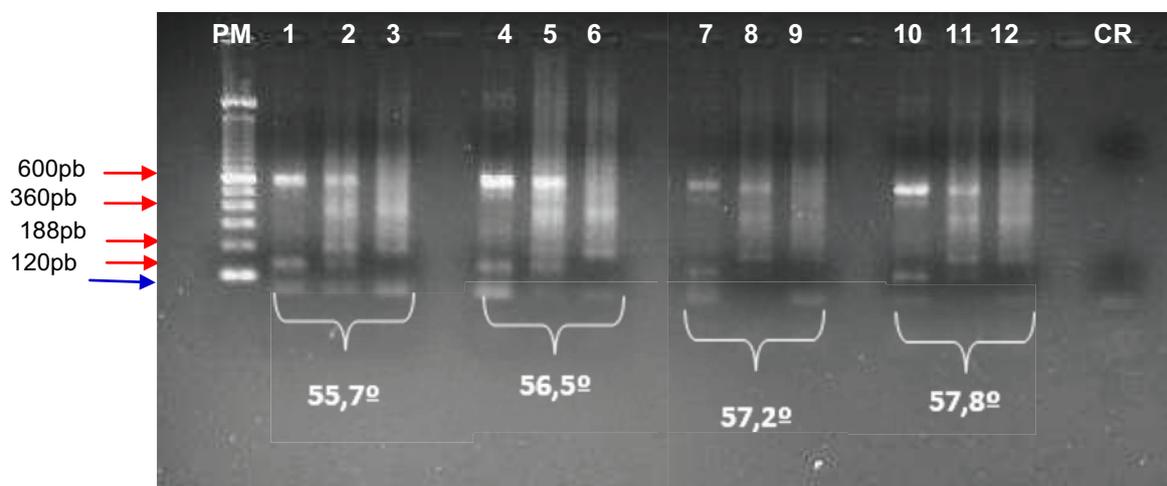


Figura 12. Perfil de fragmentos amplificados pela PCR quando empregado o gradiente de temperaturas de anelamento. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1, 2, 3 – temperatura de anelamento 55,7°C; 4, 5, 6 – temperatura de anelamento 56,5°C; 7, 8, 9 – temperatura de anelamento 57,2°C; temperatura de anelamento 57,8°C Linhas: 1, 4, 7 e 10 contém DNA de amostras de sangue de indivíduo não chagásico; 2, 5, 8 e 11 contém DNA de amostra sangue de indivíduo não chagásico + DNA de *T. cruzi* (0,1pg); 3, 6, 9 e 12 contém DNA de *T. cruzi* (0,1pg). Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). PM – Peso Molecular – 1000 pb; CR – controle branco, contém todos os reagentes sem DNA. Setas vermelhas indicam o tamanho dos fragmentos visualizados no gel de agarose. Seta azul= dímeros de *primers*. Fragmentos diagnósticos, 188 pb e aproximadamente 360 pb.

4.2.3.1.2 Quantidade de DNA alvo

Após a seleção da temperatura de anelamento (56°C), e comparando o perfil de bandas geradas entre as amostras de sangue reconstituídas e aquelas correspondentes ao DNA purificado de *T. cruzi* (Figura 12), ainda observa-se a presença de fragmentos inespecíficos provenientes da amplificação de DNA de sangue humano. Na tentativa de obter uma melhor definição para o padrão de bandas geradas, foram realizados ensaios com quantidades menores de DNA obtido de duas amostras de sangue que foram soropositivas para Chagas: amostra HUOC 193 (13,5 ng e 27 ng de DNA) e amostra HUOC 220 (79,5 ng e 159 ng de DNA). Porém, mesmo diminuindo a quantidade de DNA por reação, foi possível observar o mesmo perfil de bandas inespecíficas e a ausência do fragmento de 188 pb correspondente às seqüências satélites nucleares do parasito. Na Figura 13, pode-se visualizar os três fragmentos de aproximadamente 120, 300 e 600 pb nas linhas 1

a 4 (DNA extraído de amostras de sangue de pacientes chagásico) e no controle positivo (CP) referente ao DNA de tripomastigotas de *T. cruzi*, observa-se a presença do fragmento específico de 188 pb, além de outra banda de maior peso molecular (em torno de 360 pb).

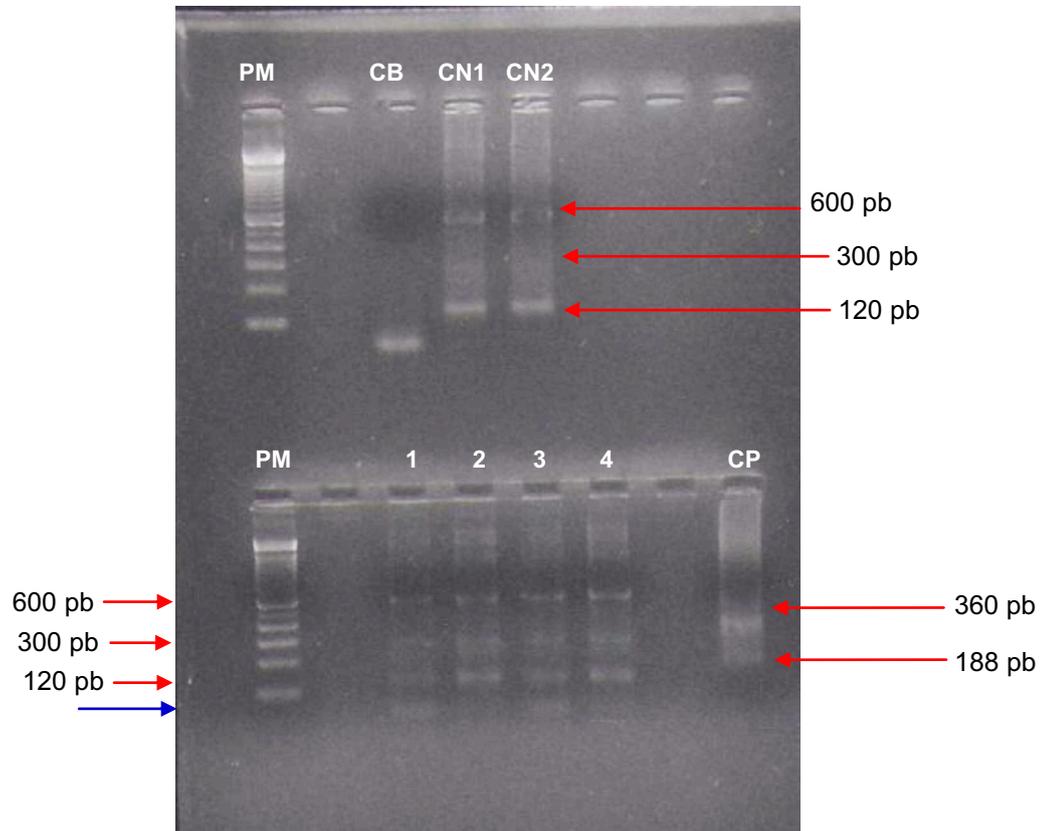


Figura 13. Perfil de fragmentos amplificados pela PCR utilizando menores quantidades de DNA extraído de amostras de sangue de pacientes chagásicos. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 – HUOC 220 (159 ng); 2- HUOC 193 (27 ng); 3- HUOC 220 (79,5 ng); 4 - HUOC 193 (13,5 ng); gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). PM – Peso Molecular – 1000 pb; CN 1 e 2 – Controle negativo contém os reagentes da PCR e amostra de sangue de pacientes chagásicos, CB – Controle branco contém todos reagentes da PCR e mais água sem DNA de *T. cruzi*; CP – Controle Positivo contém todos os reagentes e DNA de *T. cruzi* (0,1pg). Seta em azul= dímeros de *primers*. Seta em vermelho= fragmentos de 188 pb, aproximadamente 120 pb, 300 pb, 360 pb e 600 pb.

4.2.3.2 PCR em amostras de Soro

Essa secção aborda a otimização da técnica de PCR a partir da utilização de DNA obtido de amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos e de indivíduos não chagásicos.

4.2.3.2.1 Quantidade de primers

Em relação à aplicação da técnica em amostras de soro, o primeiro passo foi ajustar a concentração de *primers*, a fim de evitar a formação de dímeros que pode ocorrer devido ao seu excesso na reação. A Figura 14, aponta que a concentração de 20 pmol por reação foi a mais indicada, considerando que houve uma diminuição da sensibilidade de detecção quando utilizadas as concentrações correspondentes a 15 e 10 pmol. Isso pode ser observado quando comparadas as linhas 2, 7 e 12, que contém DNA obtido de amostra de soro do mesmo paciente. Pode-se observar a visualização do fragmento de 188 pb na linha 2 e a não visualização nas linhas 7 e 12 da Figura 14.

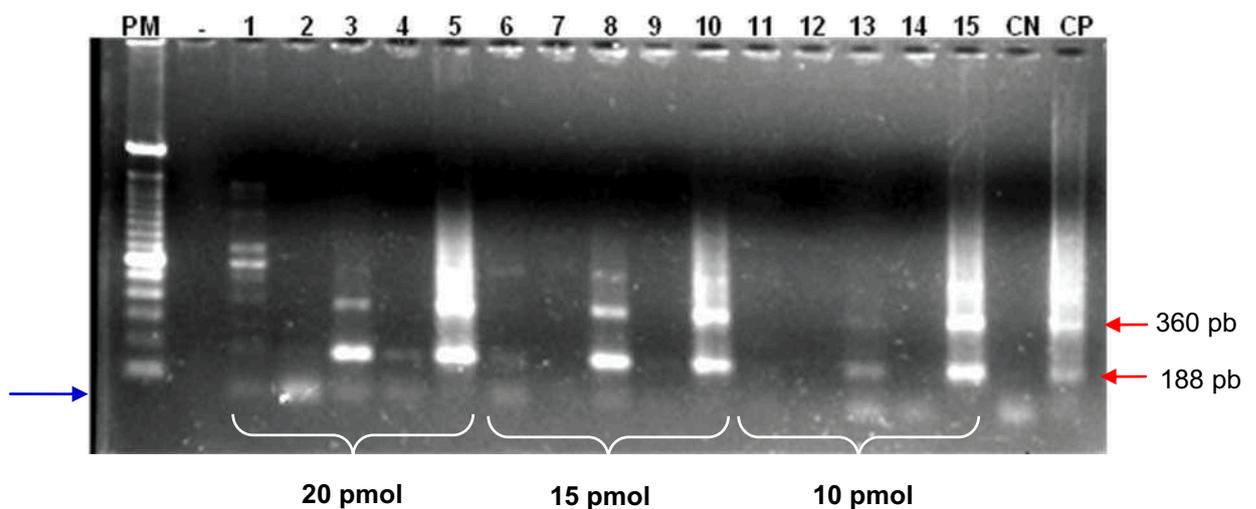


Figura 14. Fragmentos da amplificação de DNA do gene de *T. cruzi* obtido de amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos produzidos pela PCR utilizando diferentes concentrações de *primers*. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1, 2, 3, 4 e 5 – Reação contendo 20 pmol de cada *primer*; 6, 7, 8, 9 e 10 – Reação contendo 15 pmol de cada *primer*; 11, 12, 13, 14 e 15 – Reação contendo 10 pmol de cada *primer*. Linhas: 1, 6, 11 – paciente 193; 2, 7, 12 – paciente 194; 3, 8, 13 – paciente 195; 4, 9, 14 – pacientes 196; 5, 10, 15 – paciente 220. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). PM- Peso Molecular – 1000 pb; CN – Controle negativo contém os reagentes da PCR e amostra de soro de pacientes chagásicos. CP – Controle Positivo contém todos os reagentes e DNA de *T. cruzi* (0,1pg). Seta em azul= dímeros de *primers*. Seta em vermelho = fragmentos diagnósticos.

4.2.3.3 Limite de detecção da PCR em amostras reconstituídas

a) SANGUE

A competição dos *primers* em se anelar a outras seqüências de DNA ficou bem evidenciada ao analisar os resultados obtidos para a determinação do limite de detecção, onde foram empregados DNA obtido de amostras de sangue de indivíduos soronegativos as quais foram suplementadas com quantidades decrescentes de células de *T. cruzi* (diluições seriadas com fator 10, variando de 10^3 a 0 parasitos). Na Figura 15, pode ser observado que à medida que se diminui a concentração de células do parasito, os fragmentos amplificados tornam-se mais bem definidos, realçando os fragmentos específicos de 188 pb e 360 pb . O limite de detecção alcançado foi relacionado à diluição equivalente a 10^{-1} parasitos (linha 5). Considerando que um único parasito contém aproximadamente 300 fg de DNA, conseguiu-se detectar até 30 fg de DNA de *T. cruzi* misturado em sangue. Um dado importante na figura 15 é a visualização do fragmento com aproximadamente 600 pb, apenas observado quando a quantidade de DNA de *T. cruzi* se torna mais escassa dentro da amostra de sangue (linhas 5 e 6) sendo presente também no controle de DNA obtido de amostra de sangue de indivíduo não chagásico (linha CN).

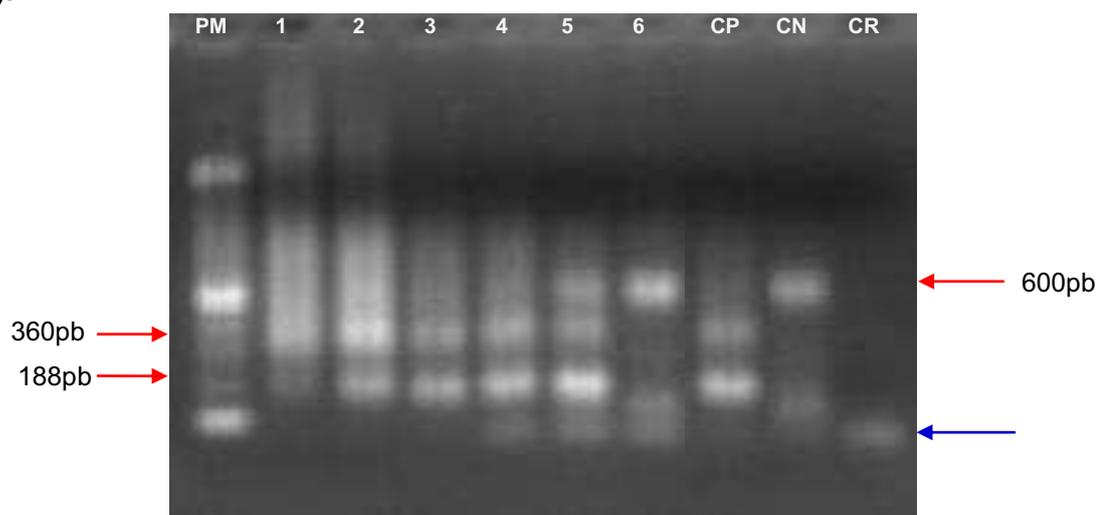


Figura 15. Fragmentos da amplificação do DNA de *T. cruzi* pela PCR utilizando DNA obtido da reconstituição de amostras de sangue de indivíduos não chagásicos contendo concentrações decrescentes de células de *T. cruzi* para o estabelecimento do limite de detecção. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 - 10^3 , 2 - 10^2 , 3 - 10, 4 - 1, 5 - 10^{-1} , 6 - 0 parasitos, diluídas em amostra de sangue de indivíduo não chagásico (soronegativo); gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL).PM- Peso Molecular – 1000 pb; CP-controle positivo, amostra de DNA de tripomastigota de *T. cruzi*; CN- controle negativo, amostra de DNA de sangue de indivíduo não chagásico; CR- controle da reação, apenas reagentes da PCR. Seta em azul= dímeros de *primers*. Seta em vermelho= fragmentos de 188 pb, de aproximadamente 360 pb e 600 pb.

b) SORO

Em relação às amostras de soro, constatou-se que não houve diminuição da sensibilidade de detecção empregando amostras de soro reconstituídas contendo as mesmas diluições de DNA de *T. cruzi* usadas para os ensaios com sangue, isto é, obteve-se com soro o mesmo limite de detecção alcançado com sangue, equivalente a 10^{-1} parasitos (Figura 16, linha 3).

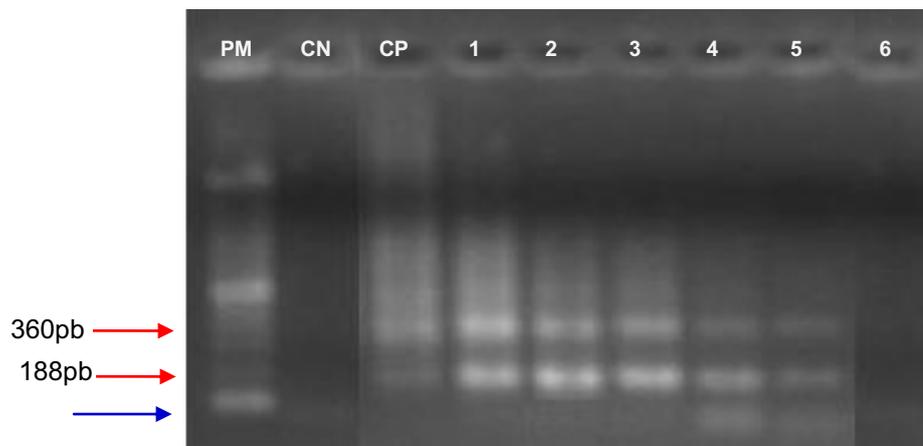


Figura 16. Fragmentos da amplificação do DNA de *T. cruzi* pela PCR utilizando DNA obtido da reconstituição de amostras de soro de indivíduos não chagásicos contendo concentrações decrescentes de células de *T. cruzi* para o estabelecimento do limite de detecção. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 - 10^3 , 2 - 10^2 , 3 - 10, 4 - 1, 5 - 10^{-1} , 6 - 0 parasitos, diluídas em amostra de soro de indivíduo não chagásico (soronegativo); gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). PM- Peso Molecular - 1000 pb; CP- controle positivo, amostra de DNA de tripomastigota de *T. cruzi*; CN- controle negativo, amostra de DNA de sangue de indivíduo não chagásico; CR- controle da reação, apenas reagentes da PCR. Seta em azul= dímeros de *primers*. Seta em vermelho= fragmentos de 188 pb, de aproximadamente 360 pb e 600 pb.

4.3 Aplicação da PCR para a detecção de DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostras de sangue e de soro

Primeiramente foram estabelecidas as condições otimizadas da PCR utilizando os *primers* TCZ1 e TCZ2 em amostras de DNA de *T. cruzi* obtidas de cultura celular e, posteriormente foi aplicado o ensaio em amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos. A reação foi padronizada para um volume final de 50 μ L contendo: 2,5 U (0,05 U/ μ L) de Taq polimerase platinum,

1,5 Mm de $MgCl_2$, 200 μM de cada dNTP e 20 pmol de cada *primer*. Além disso, foram modificadas as condições de ciclagem anteriormente descritas por Moser et al., (1989), passando para 35 ciclos de amplificação e temperatura de anelamento a 56°C. Essas condições foram utilizadas no diagnóstico molecular das amostras de sangue e soro dos indivíduos não chagásicos e pacientes chagásicos.

Visto que as bandas de 188 pb e/ou a de aproximadamente 360 pb estão presentes quando utilizamos DNA obtido de cultura de *T. cruzi* e em algumas amostras de pacientes chagásicos, observadas nos ensaios da padronização, foram consideradas bandas diagnosticas para esse trabalho. Essa banda de aproximadamente 360 pb pode ocorrer, uma vez que o excesso de DNA alvo no genoma (tandem) quando amplificado produz fragmentos com tamanhos maiores que o esperado, como mostra a figura 17, pois os *primers* tendem a se anelar distantes um do outro.

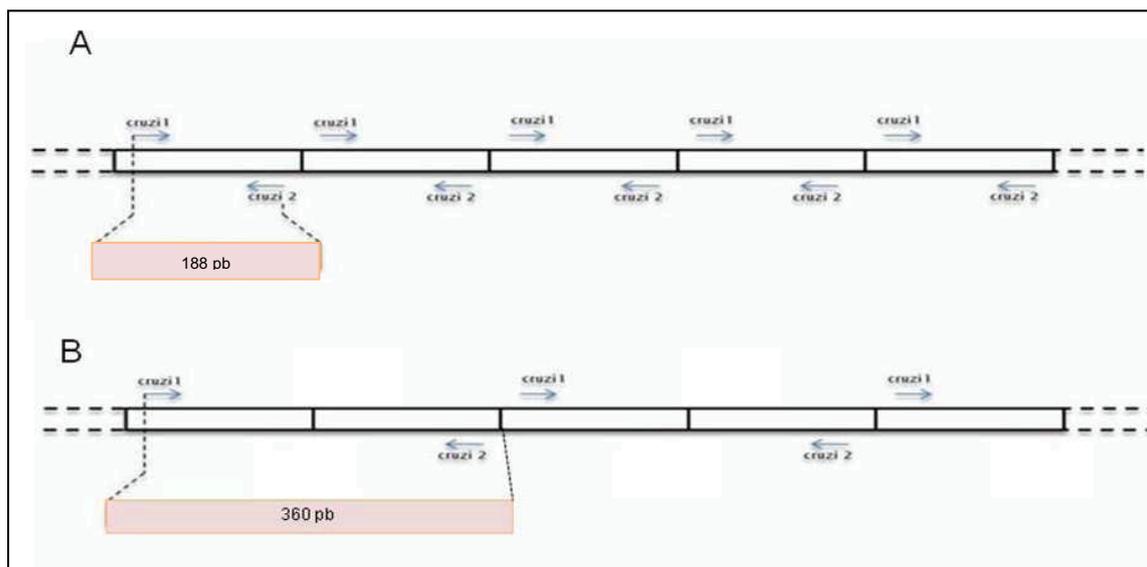


Figura 17. Amplificação do DNA de *T. cruzi*. Fonte: Elaboração própria. Nota: A- Amplificação de DNA com quantidades equivalentes de alvo e *primers*; B – Amplificação de DNA com maiores quantidades de alvo em relação à concentração fixa de *primers* na reação.

4.3.1 Amostras de sangue

As 65 amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos e 35 indivíduos não chagásicos foram avaliadas. Utilizou-se 5 μL de DNA purificado de cada amostra para amplificação com os *primers* TCZ1 e TCZ2.

Após a eletroforese em gel de agarose a 2 %, observou-se que, das amostras soropositivas para Chagas, apenas 13 das 65 (20%) apresentaram a banda específica de 188 pb. Além dessas, 14 amostras revelaram o fragmento de 360 pb, o qual representa um outro marcador de DNA de *T. cruzi*. Totalizando assim 27 amostras PCR positivas entre os 65 pacientes chagásicos. Curiosamente, das 35 amostras de indivíduos soronegativos, três foram positivas pela PCR.

4.3.2 Amostras de soro

Dez microlitros de DNA de cada amostra de soro obtido dos 65 pacientes chagásicos crônicos e dos 35 indivíduos não chagásicos foram utilizados na reação. Dos 65 pacientes soropositivos, 38 (58,5%) apresentaram o seu material amplificado e 27 (41,5%) não revelaram a presença de DNA de *T. cruzi* no soro. Com relação ao grupo controle apenas um, de área endêmica, apresentou a banda de 188 pb. Todas as amostras positivas apresentaram a banda de 188 pb ou as duas bandas, 188 pb e a de aproximadamente de 360 pb, no gel de agarose a 2%.

A amostra com maior número de pacientes que apresentaram resultado positivo foi a amostra de soro (38), enquanto que apenas 27 amostras de sangue amplificaram o DNA do *T. cruzi*. As 65 (38+27) amostras com resultados positivos na PCR são provenientes de apenas 51 pacientes, ou seja, 14 pacientes chagásicos apresentaram resultado positivo nas duas amostras analisadas (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados da PCR com os *primers* TCZ1 e TCZ2 frente à amostra utilizada dos pacientes chagásicos.

Amostras de pacientes chagásicos crônicos	Resultados positivos da PCR TCZ1 e TCZ2
Sangue	27/65
Soro	38/65
Total de pacientes com resultado positivo na PCR	51/65

Fonte: Elaboração própria.

4.3.3 Ensaios de PCR para o gene da β -globina humana

c) AMOSTRAS DE SANGUE

Todas as 38 amostras testadas continham DNA íntegro, não existindo nenhum tipo de inibição, uma vez que amplificaram a seqüência de DNA do gene humano da β -globina (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados da PCR β -globina das amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos frente aos resultados da PCR TCZ1 e TCZ2

Amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos (n=65)	PCR TCZ1 e TCZ2	
	Positivo	Negativo
PCR β-globina	27	38
Positivo	NR	38
Negativo	0	0

Fonte: Elaboração própria. Nota: NR- Não Realizado

Todas as amostras negativas sangue foram positivas para a β -globina (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados da PCR β -globina das amostras de sangue de indivíduos não chagásicos frente aos resultados da PCR TCZ1 e TCZ2

Amostras sangue de indivíduos não chagásicos (n=35)	PCR TCZ1 e TCZ2	
	Positivo	Negativo
PCR β-globina	3	32
Positivo	NR	32
Negativo	0	0

Fonte: Elaboração própria. Nota: NR- Não Realizado

Pelas Tabelas 9 e 10 pode ser observado que todas as amostras de sangue que foram negativas para a presença de DNA de *T. cruzi* (primers TCZ1 e TCZ2), foram positivas para o gene da β -globina humana.

d) AMOSTRAS DE SORO

Com relação às amostras de pacientes chagásicos crônicos, das 35 PCR negativas para *T. cruzi*, apenas 24 foram positivas para o gene humano. Após realização de uma nova extração de DNA dessas amostras que apresentaram resultados negativos (n=11) para a β -globina humana, em 8 delas foi possível a detecção de DNA do parasito (Tabela 11). Dessa forma, o resultado diagnóstico foi alterado totalizando 38 amostras de soro positivas pela PCR TCZ1 e TCZ2, entre as 65 amostras de pacientes chagásicos crônicos.

Tabela 11 - Resultado da PCR β -globina das amostras soro de pacientes chagásicos crônicos

Amostras soro de pacientes chagásicos crônicos (n=65)	PCR TCZ1 e TCZ2	
	Positivo	Negativo
PCR β-globina	38	27
Positivo	NR	24
Negativo	0	3

Fonte: Elaboração própria. Nota: NR- Não Realizado

Quando realizada a PCR para β -globina nas amostras controle todas resultaram em PCR positivas (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultados da PCR β -globina das amostras soro de indivíduos não chagásicos frente aos resultados da PCR TCZ1 e TCZ2

Amostras soro de indivíduos não chagásicos (n=35)	PCR TCZ1 e TCZ2	
	Positivo	Negativo
PCR β-globina	1	34
Positivo	NR	34
Negativo	0	0

Fonte: Elaboração própria. Nota: NR- Não Realizado

As amostras de soro que após a re-extração de DNA continuaram a gerar resultados negativos para a β -globina humana (3/65; Tabela 11), foram descartadas e excluídas das análises estatísticas, totalizando assim um grupo de 62 amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos incluídos na estatística.

4.3.4 Utilização de novos primers para as seqüências nucleares satélites de *T. cruzi*

Todas as amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos crônicos que geraram resultados negativos com os *primers* TCZ1 e TCZ2 foram analisadas com outro conjunto de *primers* desenhados para as mesmas seqüências satélites de *T. cruzi*, com a finalidade de complementar o diagnóstico molecular. Assim, nos novos ensaios descritos no item 3.4.2 de Materiais e Métodos, das 38 amostras de sangue que apresentaram resultados negativos nos testes anteriores, todas apresentaram a banda de 76 pb com os novos *primers* (Figura 18) . Ou seja, 100% das amostras que antes foram negativas, continham DNA de *T. cruzi*. Com relação às amostras de soro (n=27), 16 dessas (59,26%) amplificaram o material genético do parasito. Esses resultados revelam a importância do emprego de dois ensaios moleculares com níveis distintos de sensibilidade e especificidade para complementar o diagnóstico molecular de pacientes chagásicos crônicos.

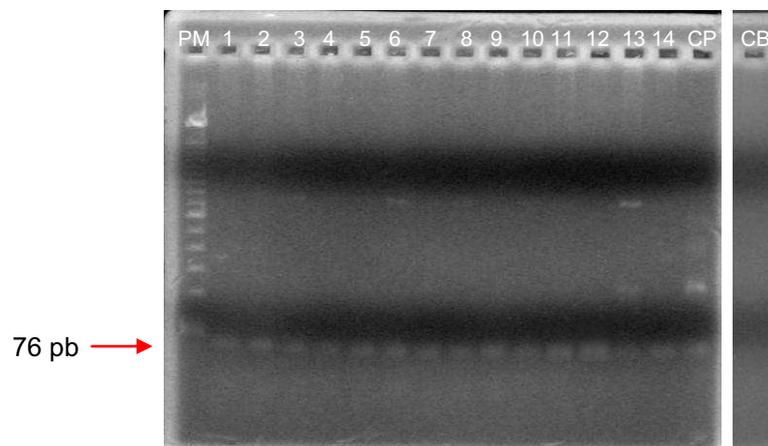


Figura 18. Fragmentos da amplificação do gene de *T. cruzi* pela PCR utilizando os *primers* modificados com as amostras de sangue de indivíduos chagásicos crônicos que apresentaram resultado negativo na PCR utilizando os *primers* TCZ1 e TCZ2. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 a 14 amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL).CP-controle positivo, amostra de DNA de tripomastigota de *T. cruzi*; CB- controle branco, amostra sem DNA, apenas reagentes e água e PM – Peso molecular. Seta em vermelho= fragmento de 76 pb.

4.4 Análise estatística dos dados

4.4.1 Sensibilidade e especificidade

Comparando os resultados dos testes de PCR com TCZ1 e TCZ2 utilizando amostras de soro e sangue de pacientes chagásicos crônicos frente aos resultados da sorologia, das 65 amostras de sangue soropositivas, apenas 27 (41,53%) amplificaram o material genético do *T. cruzi*. Das 35 amostras soronegativas, 3 (8,57%) foram positivas, e foram consideradas falso-positivas. Com relação às amostras de soro dos pacientes chagásicos crônicos, 38 (61,29%) apresentaram a banda de 188 pb e/ou a banda de aproximadamente de 360 pb, e daquelas soronegativas, apenas 1 (1,6%) amostra foi falso-positiva (Tabela 13).

Tabela 13 - Comparação dos resultados obtidos pela PCR em amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos frente aos resultados da sorologia.

	Amostras de sangue		Amostras de soro	
	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
PCR +	27(41,3%)	3 (8,57%)	38 (61,29%)	1(1,6%)
PCR -	38 (58,7%)	32 (91,43%)	24(38,71%)	34 (98,4%)
Total	65	35	62	35

Fonte: Elaboração própria

De acordo com Ferreira e Ávila (2001), a especificidade da técnica de PCR utilizando amostras de soro foi de 97,1% (IC= 83,4 ~ 99,9), enquanto a sensibilidade foi 61,3% (IC= 48 ~ 73,1). Quanto às amostras de sangue a sensibilidade foi reduzida a 41,5% (IC= 29,7 ~ 54,4) e a especificidade foi de 91,4% (IC= 75,8 ~ 97,8).

Um dado importante encontrado nos resultados foi relacionado à taxa de positividade quando utilizado o ensaio de PCR com DNA extraído de sangue total e de soro concomitantemente. A sensibilidade alcançada aumentou para 78,5% (IC= 66,2 ~ 87,3) enquanto a especificidade se encontra com 88,6% (72,3 ~ 96,3) (figura 19).

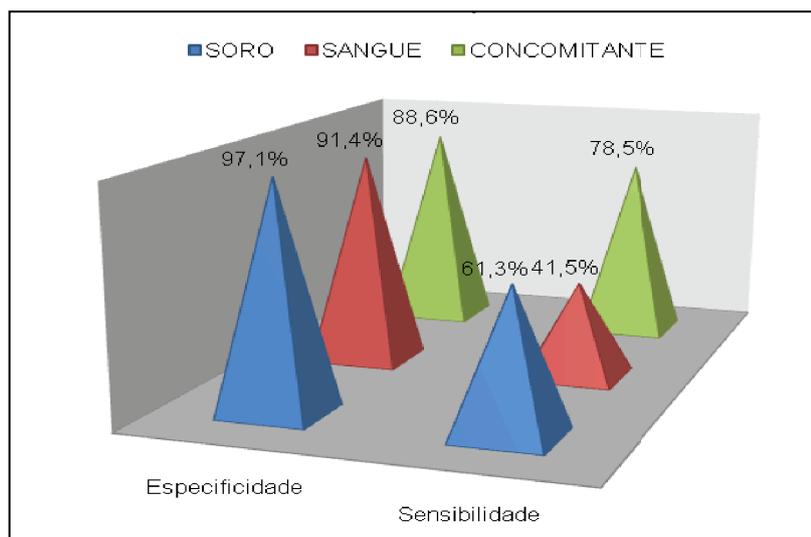


Figura 19. Especificidade e sensibilidade da PCR utilizando os diferentes tipos de amostras. Fonte: Elaboração própria

Os dados da especificidade da técnica utilizando a amostra de soro, sangue e as duas amostras concomitantes foram analisados estatisticamente e, foi observado que não houve diferença estatística entre as três formas de uso das amostras (SORO x SANGUE: $p = 0,614$; SORO x Concomitante: $p = 0,356$; SANGUE x Concomitante: $p = 1,000$). Com relação à sensibilidade, quando comparado o resultado das amostras de sangue *versus* soro, e sangue *versus* amostras concomitantes houve diferenças estatísticas (SANGUE x SORO: $p = 0,033$; SANGUE x Concomitante: $p = 0,000$), contudo, quando analisado o resultado do soro frente o uso das amostras simultaneamente o valor de p foi maior que 5% (SORO x Concomitante: $p = 0,052$), ou seja, não houve diferença.

4.4.2 Teste de concordância

Após análise dos géis fotodocumentados por dois observadores, os resultados foram usados no programa de estatística para a identificação do índice Kappa, ou teste de concordância. A concordância observada nos resultados da PCR com as amostras de soro foi 0,779 e o valor da taxa observada foi de 91%, e os resultados foram significantes com $p < 0,001$.

Com relação aos resultados com as amostras de sangue foi observada concordância regular ($K = 0,453$) tendo como taxa observada de 86% ($p < 0,001$).

Quando comparados os dados dos observadores frente aos resultados da PCR com amostras de sangue e soro não existiu diferença significativa ($p > 0,001$), ou seja, para ambos foi semelhante a visualização ou não das bandas específicas.

4.4.3 Formas clínicas X PCR

Foi realizada uma análise estatística de acordo com a forma clínica dos pacientes e o resultado positivo gerado pela PCR em soro e sangue. Dentre as formas clínicas dos pacientes chagásicos, a que apresentou maior número de resultados positivos na PCR, utilizando DNA purificado de soro e sangue, foi a forma cardíaca, com 63% e 44% respectivamente (Tabela 14).

Tabela 14 - Associação dos resultados de PCR positivo em soro e sangue e formas clínicas dos pacientes chagásicos crônicos

Formas clínica	Amostras Soro de Pacientes chagásicos PCR+ (n=38)	Porcentagem (%)	Formas clínica	Amostras Sangue de Pacientes chagásicos PCR+ (n=27)	Porcentagem (%)
FD	4	11	FD	2	7
FC	24	63	FC	12	44
FI	4	11	FI	5	19
FM	5	14	FM	6	22
IGN	1	3	IGN	2	7

Fonte: Elaboração própria. Nota: Formas Clínicas da doença de Chagas: FD- Forma Digestiva, FC- Forma Cardíaca, FI- Forma Indeterminada, FM- Forma Mista, IGN- Ignorado (sem dados clínicos)

As amostras que apresentaram resultados positivos foram comparadas entre si de acordo com a forma clínica do paciente. Os resultados da análise estatística mostram que existem diferenças significativas entre a forma cardíaca em relação às demais, quando utilizada a amostra de soro dos pacientes chagásicos crônicos ($p = 0,000$). Entretanto, não houve diferenças entre as demais formas chagásicas (FD, FM, FI) ($p > 0,05$). Enquanto que a análise estatística utilizando as amostras de sangue dos pacientes chagásicos, a forma cardíaca também apresentou diferenças estatísticas (FC x FD: $p = 0,01$; FC x FI: $p = 0,03$; FC x IGN: $p = 0,01$), porém, foi

observado que não houve diferenças entre a forma cardíaca e a forma mista (FC x FM: $p = 0,075$) como também não existiu com as demais formas entre si (FD, FM, FI) ($p > 0,05$).

4.4.4 *Idade X Formas clínicas X Sexo*

O grupo etário predominante dos pacientes chagásicos crônicos selecionados ($n = 65$) foi a faixa de 20 a 59 anos (55,4%) e o sexo foi o feminino com 60% do total. Quando associada à idade e formas clínicas, não houve diferença significativa ($p = 0,2947$), como também não existiu entre a associação do sexo dos pacientes e formas clínicas ($p = 0,9469$).

5 DISCUSSÃO

A doença de Chagas, por apresentar na fase aguda da infecção sintomatologia semelhante à de outras doenças, passa muitas vezes despercebida pelo indivíduo infectado, sendo o diagnóstico realizado apenas na sua fase crônica da doença. Gomes et al. (2000) observaram que 79,2% dos pacientes descobriram a doença quando apresentaram estado avançado dos sintomas e procuraram ajuda médica, e que 8,3% detectaram a patologia logo após doação de sangue.

Atualmente, a sorologia e o método parasitológico são as técnicas mais aplicadas no diagnóstico etiológico da doença (LUQUETTI; RASSI, 2000). Na tentativa de diagnosticar precocemente e melhorar o prognóstico dos pacientes chagásicos surgiram diversas técnicas. Diante da aplicabilidade que a biologia molecular propicia, surgiram novos interesses no estudo da genética do *T. cruzi*. Como contribuição dessas técnicas foi possível detectar o parasito em pequenas quantidades de amostras e confirmar o diagnóstico da infecção (BRITTO et al., 1993; BRITTO et al., 1995; DIAZ et al., 1992; GOMES et al., 1998; JONES et al., 1993; MOSER et al., 1989; RUSSOMANDO et al., 1992; STURM et al., 1989; VIRREIRA et al., 2003).

Contudo, para que uma nova técnica seja inserida na rotina dos laboratórios é preciso analisar a sua eficácia em relação à sensibilidade e à especificidade, além de que esta deve apresentar preferencialmente baixo custo e baixa complexidade, alcançando o resultado desejado em tempo mínimo (MARCON et al., 2002).

O presente projeto avaliou a técnica da PCR quanto ao seu desempenho em detectar DNA de *T. cruzi* em sangue e soro de pacientes chagásicos crônicos. Para isso, foi necessário padronizar a referida técnica para posterior utilização com amostras de pacientes.

Um passo importante na realização da PCR é a amplificação do DNA, sendo crucial a escolha dos *primers*. Os pares TCZ1 e TCZ2, descritos por Moser et al. (1989), amplificam uma seqüência da região satélite repetitiva de 195 pb presentes no DNA nuclear de *T. cruzi*, que se repetem em 120.000 cópias no genoma.

Para desenvolver uma PCR capaz de identificar pacientes chagásicos crônicos, os quais apresentam uma baixa carga de DNA do protozoário, foi necessário reproduzir algumas técnicas utilizadas na literatura. Optou-se em reproduzir as ciclagens descritas por Moser et al. (1989) e Russomando et al. (1992) nas condições do laboratório, já que o primeiro desenhou os referidos *primers* nucleares específicos para DNA de *T. cruzi* enquanto os outros detectaram o DNA do parasita em amostras de soro de pacientes chagásicos. Após a avaliação dos protocolos, foi verificado que a ciclagem de Moser et al. (1989) apresentou um limite de detecção 10x maior (0,1 pg) que a ciclagem de Russomando et al. (1992) (1 pg), indicando que o referido protocolo é o mais adequado às expectativas.

Diferentes quantidades dos *primers* foram testadas quanto ao limite de detecção. O desempenho da PCR com uma menor quantidade de *primer* (25 pmol) alcançou um limite de detecção de 0,01 pg de DNA em relação a quantidade de 50 pmol, que foi 10X menor (0,1 pg). A literatura mostra que um parasito contém uma quantidade equivalente a 0,3 pg de DNA (KIRCHHOFF et al., 1996; VIRREIRA et al., 2003), ou seja, o alcance da técnica aqui padronizada chegou a menos de um parasito.

De acordo com a literatura, o par TCZ1 e TCZ2 não amplifica DNA de outros tripanossomatídeos, incluindo as espécies de *Leishmania sp* (DIAZ et al., 1992; MOSER et al., 1989; VIRREIRA et al., 2003). Analisando a especificidade do anelamento dos *primers* TCZ1 e TCZ2 em amostras de *Leishmania sp.*, foi observado que os mesmos apresentam alta especificidade no anelamento do fragmento de DNA de *T. cruzi*, confirmado pela ausência da banda de 188 pb, corroborando com os dados prévios (DIAZ et al., 1992; MOSER et al., 1989; VIRREIRA et al., 2003).

Baseado na literatura (VIRREIRA et al., 2003), o aumento do número de ciclos pode intensificar a visualização dos *amplicons* no gel de agarose, alcançando uma maior sensibilidade da técnica. Cummings e Tarlenton (2003) observaram que a quantidade de parasitos nas amostras interfere no número de ciclos necessários, e que protocolos de PCR utilizando amostras de pacientes crônicos necessitam de maior número de ciclos. Assim, foram testados dois diferentes números de ciclos para as temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão. A técnica apresentou uma maior visualização do fragmento (Figuras 8 e 9) quando o número de ciclos foi aumentado de 25, descrito no protocolo de Moser et al. (1989), para 35

e 40. Como não houve diferenças no alcance da sensibilidade entre as quantidades de 35 e 40, foi escolhida a ciclagem com 35 ciclos.

A técnica, após a padronização, foi aplicada em amostras testes de DNA de pacientes chagásicos crônicos, utilizando tanto soro quanto sangue, quando foi observada a necessidade de aperfeiçoar alguns pontos da metodologia. Para as amostras de sangue foi necessário otimizar uma temperatura de anelamento para melhorar a especificidade de anelamento dos *primers* (MELO, 2006), pois em ensaios anteriores não foi possível identificar a banda específica de 188 pb. Por outro lado, bandas com pesos moleculares de aproximadamente 600 pb, 360 pb e 120 pb foram observadas. Para evitar o aparecimento destas bandas “inespecíficas” foi escolhida, em um gradiente, a temperatura de 56°C para o anelamento dos *primers* (Figura 12), porém essas bandas continuaram, em menor intensidade, presentes nas amostras de sangue. Desta forma, a temperatura de anelamento, 56°C, foi adotada para a ciclagem da técnica de PCR otimizada para o estudo do diagnóstico molecular da doença de Chagas crônica, permanecendo as mesmas temperaturas de desnaturação e extensão, 94°C e 72°C respectivamente.

Outra tentativa, para minimizar as bandas inespecíficas, foi a diminuição da quantidade de DNA da amostra de sangue na reação. O material extraído pode apresentar seqüências seqüestradoras de iniciadores que, desta forma, anelam-se inespecificamente (GOMES et al., 1998). Portanto, foi reduzida pela metade a quantidade em massa das amostras de pacientes chagásicos crônicos, porém, as bandas inespecíficas persistiram (Figura 13), ou seja, da mesma forma que a quantidade de amostra diminui, o DNA alvo também é diminuído, não havendo intensidade da banda de 188 pb. Por outro lado, este perfil de bandas apenas ocorreu nas amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos.

Entretanto, Gomes et al. (1998) também detectaram bandas inespecíficas utilizando *primers* para o alvo kDNA e observaram bandas de 199 pb e 750 pb, indicando que este anelamento não seria tão inespecífico. A banda de menor tamanho produzida é produto de um anelamento inadequado de seqüências do DNA humano, por isso não é visualizada quando a amostra de DNA obtida de cultura de células é utilizada, e a consideram um controle interno da reação. A banda maior é esperada devido a amplificação de 2 regiões variáveis dos minicírculos. Outros trabalhos também identificaram bandas acima da banda específica, indicando ser produtos de duas ou três seqüências que aparecem repetidas no genoma, em

tandem, e que esse fenômeno é comum (ÁVILA et al., 1993; GOMES et al., 1998; MIYAMOTO et al., 2006; VALLEJO et al., 1999; VIRREIRA et al., 2003). Além de que, esses anelamentos inadequados estão mais presentes quando a amostra contém uma maior quantidade de DNA alvo na reação, como visualizado na Figura 7 ao usar uma curva de DNA de *T. cruzi* obtido de cultura celular, e desta forma os pares tendem a se anelar em locais distantes um do outro (Figura 17). Os resultados mostram a presença de bandas, porém, quando utilizada amostra de sangue, o perfil de banda é maior em relação ao soro, o qual apresenta, na sua maioria, duas bandas (188 pb e aproximadamente 360 pb). Na Figura 12, é bem evidente a presença de duas bandas na amostra de sangue negativo (sem DNA de *T. cruzi*), uma com tamanho de aproximadamente de 120 pb e outra de aproximadamente 600 pb. Quando adicionada amostra de *T. cruzi*, nessa amostra negativa, aparecem mais duas bandas, uma com aproximadamente 360 pb e a específica dos *primers*, 188 pb. Enquanto que o perfil encontrado nas amostras de cultura, apenas duas bandas são visualizadas (188 pb e aproximadamente 360 pb).

O perfil de bandas nas amostras de sangue não foi claro em relação a visualização da banda específica. Por isso, a quantidade de *primers* também foi otimizada com a finalidade de minimizar a produção de dímeros (MELO, 2006), principalmente nas amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos. Desta forma, dentre as diferentes quantidades utilizadas (20 pmol, 15 pmol e 10 pmol de cada *primer*/reação) (Figura 14), a escolhida foi a de 20 pmol, por não produzir excesso de dímeros ao mesmo tempo em que não alterou o alcance de detecção, como mostrado nas Figuras 15 e 16. Portanto, a concentração final de cada *primer* na reação é de 0,4 pmol/ μ L, estando na média de acordo com Scheinert et al., (2005).

Depois de realizados os referidos ajustes da padronização, as amostras coletadas durante o período de 2008 e 2009 no ambulatório de Doenças de Chagas do HUOC – UPE foram analisadas através da técnica de PCR. Primeiramente, as amostras foram classificadas de acordo com a sorologia. Os pacientes chagásicos crônicos apresentaram sorologia reagente, totalizando em 65 amostras de sangue total e 65 amostras de soro. O grupo controle foi constituído de indivíduos não chagásicos que apresentaram sorologia não reagente, sendo obtido um número de 35 amostras tanto de sangue como de soro.

Torna-se importante ressaltar que a maioria dos pacientes selecionados reside no interior do estado de Pernambuco, com 25% natural da microrregião da Mata Setentrional e 20% do Médio Capibaribe. O tratamento e acompanhamento ocorrem nos hospitais e ambulatórios da capital do estado, pois estes são referência em doença de Chagas (BRAZ et al., 2009). Os pacientes se encontram principalmente entre a faixa de 20 a 59 anos (55,4%) e 44,6% entre a faixa de 60 a mais, sendo o sexo predominante o feminino com 60%. Esses resultados corroboram com os dados de Gomes et al. (2000), em que a idade foi em torno de 46,9 +/- 10,1 anos. Porém, não existe relação entre a idade e o sexo com o fato de se infectar ou adoecer por doença de Chagas, o que também foi encontrado nos dados de Melo et al., (2009).

Antes de passar a etapa de diagnóstico molecular, foram avaliados 3 métodos de extração a partir de amostras de soro (MELO et al., 2009; MOUTINHO et al., 2009). A integralidade do DNA entre os três métodos avaliados indicou que a sílica apresentava melhores resultados na PCR. Entretanto, entre os dois *kits* que utilizam membrana de sílica, o *kit* "QIAamp DNA Blood Mini Kit" da marca Qiagen® se destacou por extrair o DNA em melhores condições de pureza (Figura 10 e Tabela 6).

A dosagem de sangue e soro dos indivíduos estudados foi bastante diferente. As amostras de sangue apresentaram aproximadamente 2x mais DNA (Média=44,75 ng/ μ L) em relação às amostras de soro (Média=27,08 ng/ μ L). Tal diferença nas dosagens influenciou na escolha do volume de DNA utilizado na reação. Ou seja, para amostra de sangue foram utilizados 5 μ L de DNA e, 10 μ L para soro (MOUTINHO et al., 2009). No estudo de Virreira et al., (2003) foram utilizadas quantidades de 10 a 15 ng de DNA, porém, extraído de sangue de pacientes agudos. Amostras coletadas em áreas endêmicas acarretam no aumento da sensibilidade principalmente se a prevalência de fase aguda for alta (JUNQUEIRA et al., 1996) e, altas quantidades de DNA na reação podem ocasionar inibição da amplificação e/ou anelamentos inespecíficos (GOMES et al., 1998; MELO, 2006).

Os resultados da técnica de PCR utilizando amostras de sangue dos indivíduos envolvidos no estudo, segundo a ciclagem padronizada, mostraram que das 65 amostras de pacientes chagásicos crônicos apenas 27 apresentaram a banda específica de 188 pb e/ou a banda de aproximadamente de 360 pb. Das 35 amostras de indivíduos não chagásicos, 3 indivíduos apresentaram resultados falsos

positivos. Em contra partida, das 65 amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos, em 38 foi visualizada a banda específica de 188 pb e/ou a banda de aproximadamente de 360 pb, enquanto que das 35 amostras de soro de indivíduos não chagásicos, apenas 1 apresentou resultado falso positivo.

As amostras de sangue (n=38) e de soro (n=27) de pacientes chagásicos crônicos que não apresentaram resultados positivos no teste molecular, como também as amostras de indivíduos não chagásicos (n=35), foram submetidas a PCR utilizando os *primers* PC03 e PC04 para avaliar se realmente houve a obtenção do material genético de *T. cruzi* no momento da extração (SAIKI et al., 1985).

O resultado dessa reação demonstrou que não houve inibidores na extração, confirmado pela visualização da banda específica de 110 pb pertencente à seqüência do gene da β -globina humana. Isto indica que o protocolo de extração foi adequado e bem desenvolvido. Por outro lado, algumas amostras de soro obtiveram resultado da PCR para β -globina negativa (n=11), essas amostras foram re-extraídas e re-testadas. Dessas, apenas 3 continuaram negativas e desta forma foram excluídas do estudo, e o número de amostras de soro de pacientes chagásico totalizou em 62. Diante desses resultados, foram realizados os cálculos para definição da sensibilidade e especificidade da técnica para as amostras de sangue e de soro.

Verificou-se uma maior sensibilidade, 61,3% (IC= 48 ~ 73,1) quando utilizado amostras de soro em relação as amostras de sangue que foi de 41,5% (IC= 29,7 ~ 54,4). Os resultados, com relação à sensibilidade da PCR no sangue, discordam do percentual obtido em trabalhos de outros pesquisadores (ÁVILA et al., 1993; BRITTO et al., 1995; CASTRO et al., 2002; COURA et al., 1996; FERNANDES et al., 2002; GOMES et al., 1998; JUNQUEIRA et al., 1996; WINCKER et al., 1994 (a), 1994 (b)) que observaram sensibilidade entre 44,6 a 100% quando amostras de sangue humano foram utilizadas. Esta variação pode ser tanto devido às diferenças genéticas que o parasito apresenta (MIYAMOTO et al., 2006) quanto ao protocolo utilizado (GOMES et al., 1998). Porém, a sensibilidade de 61,3% encontrada na PCR em amostras de soro é semelhante à média do parâmetro encontrado por estes autores. Isto demonstra que o soro pode ser utilizado como amostra biológica para PCR utilizando os *primers* TCZ1 e TCZ2 na detecção de infecção chagásica crônica. Além disso, a sensibilidade da PCR pode se elevar quando mais de uma coleta de sangue for realizada, minimizando o número de resultados falsos

negativos (CASTRO et al., 2002; DUFFY et al., 2009; JUNQUEIRA et al., 1996). Junqueira et al. (1996) sugerem coletar maiores volumes de sangue para que o sucesso da PCR seja alcançado e, Duffy et al. (2009) indicam que a coleta de mais de uma amostra aumenta a sensibilidade da técnica.

Foi possível observar que a especificidade da PCR realizada com as amostras de sangue e de soro foi similar apresentando 91,4% (IC= 75,8 ~ 97,8) e 97,1% (IC= 83,4 ~ 99,9), respectivamente.

Nos resultados obtidos neste trabalho todos os pacientes chagásicos apresentaram resultados positivos na sorologia (65). Contudo, das 65 amostras positivas na PCR (soro=38 e sangue=27) são provenientes de 51 pacientes, ou seja, 14 pacientes apresentaram resultados positivos para os dois tipos de amostra. A partir desses dados foi possível calcular a sensibilidade e especificidade da PCR quando utilizadas as amostras de sangue e soro concomitantemente. Enquanto que a especificidade diminuiu para 88,6% (72,3 ~ 96,3), a sensibilidade aumentou para 78,5% (IC = 66,2 ~ 87,3). A sensibilidade aqui calculada corrobora com a literatura, no qual indicam que a utilização de mais de uma amostra coletada aumenta a chances de detecção de DNA (CASTRO et al., 2002; DUFFY et al., 2009; JUNQUEIRA et al., 1996).

Dos indivíduos não chagásicos analisados nessa pesquisa, 4 apresentaram PCR positiva (3 PCR de sangue e 1 PCR de soro), sendo considerados resultados falsos positivos. Ávila et al. (1993) e Gomes et al. (1999) obtiveram resultados em que a PCR foi positiva e a sorologia negativa. Castro et al. (2002) demonstraram também resultados falsos positivos, e atribuem a este fato a possibilidade da especificidade dos *primers* utilizados. Além disso, tem sido sugerido que amostras com resultados divergentes deveriam ser testadas com outros *primers* específicos tanto para *T. cruzi* quanto para *T. rangeli* (VALLEJO et al., 1999). Isto pode indicar que esses indivíduos com PCR falsos positivos possam estar infectados com outras espécies de tripanossomas, uma vez que a prevalência de infecção pelo *T. rangeli* tem sido mostrada em regiões endêmicas da doença de Chagas (RAMIREZ et al., 1997). O que não pode ser relacionado com os resultados obtidos nesse trabalho, pois Moser et al. (1989) e Virreira et al. (2003) analisaram os *primers* TCZ1 e TCZ2 utilizando amostras de outros tripanossomatídeos. Portanto, uma explicação plausível para esses resultados é que estes 4 indivíduos apresentam residência em áreas endêmicas para a doença de Chagas. Esses indivíduos poderiam ainda não

apresentar anticorpos circulantes anti-*T. cruzi* (BRENIERE et al., 1984; CASTRO et al., 2002) e por isso não foram diagnosticados na sorologia. Alguns pesquisadores consideram que testes sorológicos não possam detectar a infecção de alguns indivíduos chagásicos, ou por conterem baixo título de imunoglobulinas ou por apresentarem distúrbios humorais (BRENIERE et al., 1984; BRENIERE et al., 1989; GOMES et al., 1999; LUQUETTI, 1987).

O fato de amostras de pacientes chagásicos crônicos ter apresentado resultados negativos na PCR, tanto sangue quanto soro, pode ser explicado pela progressão da doença e sua relação com o nível de parasitemia detectável pela PCR, indicando que a sensibilidade da técnica sofre redução dependendo da fase em que se encontra o paciente chagásico (BASQUIERA et al., 2003). Alguns pesquisadores relatam que a área endêmica onde o paciente vive interfere no diagnóstico molecular, devido a diferenças de cepas de *T. cruzi* presentes na região, como também a quantidade de parasitos circulantes na hora da coleta de sangue (BASQUIERA et al., 2003; JUNQUEIRA et al., 1996; MIYAMOTO et al., 2006; PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003) e ao tipo de protocolo utilizado (GOMES et al., 1998).

Para confirmar a presença de DNA de *T. cruzi* nas amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos com resultado negativo na PCR, foram utilizados os pares de *primers* desenhados e padronizados no laboratório de Biologia Molecular e Doença Endêmicas do Instituto Oswaldo Cruz. Das 38 amostras de sangue negativas, 100% amplificaram o DNA do parasito, e 16 amostras de soro (27 amostras negativas) resultaram com a amplificação da banda de 76 pb. Esses *primers* são mais sensíveis que os desenhados por Moser et al. (1989). Esse ensaio teve o objetivo de complementar os resultados desse trabalho com os pares TCZ1 e TCZ2, que apresentam alta especificidade (91,4% a 97,1%).

De acordo com a Figura 19, foi possível avaliar a relação da sensibilidade e especificidade quando as amostras foram analisadas separadamente e concomitantemente. Houve diferenças significativas entre a sensibilidade das técnicas quando as amostras de soro e de sangue individualmente foram aplicadas na reação ($p = 0,03$), como também existiram diferenças entre a sensibilidade encontrada com as amostras de sangue e as amostras utilizadas simultaneamente ($p < 0,05$). Entretanto quando analisados os resultados com as amostras de sangue e de soro concomitantes verso o resultado da sensibilidade com amostras de soro,

não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$). A especificidade da PCR analisada tanto com amostras individualmente ou concomitantemente não apresentou diferenças significativas. Esses resultados indicam que a técnica apresenta sensibilidade alta quando utilizadas amostras de soro ou sangue e soro simultaneamente, e que a especificidade da técnica é alta quando qualquer tipo de amostra é aplicada.

Esses resultados confirmam que a PCR, utilizando os *primers* TCZ1 e TCZ2, é uma técnica com alta especificidade e que se utilizarmos amostra de soro e sangue simultaneamente, apresentará uma maior sensibilidade em relação à utilização apenas de amostras individualmente, corroborando para os dados da literatura (CASTRO et al., 2002; DUFFY et al., 2009; JUNQUEIRA et al., 1996). Isto permite afirmar que a utilização das duas amostras biológicas para realização da PCR fornece melhores resultados para diagnosticar a doença de Chagas em indivíduos crônicos. A técnica não apresentou diferenças significativas na comparação entre as especificidades entre as amostras. Porém, quando utilizadas amostras de soro, essa especificidade foi alta em relação às demais, 97,1% (IC= 83,4 ~ 99,9).

A análise de dois observadores, no que tange os resultados da PCR para amostras de sangue, resultou em uma concordância de 45,3%, indicando um percentual “regular” de acordo com a escala de Andrade e Zicher (1997). Em relação à análise das amostras de soro, a concordância resultante foi de 77,9%, considerada “boa” na referida escala.

Quando comparados os dados dos dois observadores frente aos resultados da PCR com a amostra de sangue e de soro não existiu diferenças, ou seja, esta análise indica que a visualização dos resultados da PCR, realizada com os *primers* TCZ1 e TCZ2, foi considerada adequada, podendo ser aplicada em laboratórios de diagnóstico, onde a análise do gel pode ser feita sem a necessidade de pessoal especializado, sendo considerada uma PCR de fácil leitura.

Foi possível analisar as formas clínicas dos pacientes chagásicos e os resultados da PCR positiva. Dentre as formas crônicas a que apresentou maior positividade foi a forma cardíaca, e esta, por sua vez, foi diferente estatisticamente das demais ($p < 0,05$) quando analisado frente os resultados da PCR com amostras de soro. Entretanto, quando utilizadas as amostras de sangue apenas a forma cardíaca apresentou diferenças entre as formas digestivas, indeterminada, sendo

semelhante com a forma mista. Assim, a utilização de amostras de soro para verificar diferenças entre o resultado da PCR frente às formas clínicas apresentou um resultado mais refinado em relação ao uso de amostras de sangue.

A literatura (LUQUETTI et al., 2009) mostra que a forma cardíaca apresenta um número mais elevado de parasitos em relação as outras formas, o que foi evidenciado com o elevado nível de título de anticorpos contra o *T. cruzi* (NAVA, et al., 2001) e valores de citocinas.

6 CONCLUSÕES

- a) A realização da PCR em amostras de soro mostrou uma maior sensibilidade (61,3%) quando comparada a PCR utilizando amostras de sangue (41,5%), sendo semelhante estatisticamente quando utilizadas as amostras concomitantes (78,5%). Os resultados indicam que a utilização do soro ou duas amostras concomitantes podem resultar em diagnóstico mais sensível para indivíduos com doença de Chagas crônica;
- b) Na interpretação do gel por dois observadores, obteve-se uma concordância considerada boa pelo índice Kappa (77,9%) com amostras de soro. Desta forma, conclui-se que a técnica de PCR padronizada utilizando amostras de soro apresenta fácil leitura em relação ao uso de amostras de sangue;
- c) Quando utilizado outros *primers* foi possível obter a amplificação das amostras de pacientes chagásicos com resultado negativos na PCR (100% e 59,26% quando utilizado DNA de amostras de sangue e soro respectivamente), indicando que os *primers* TCZ 1 e TCZ2 não apresentaram um resultado satisfatório para detectar DNA de *T. cruzi* em amostras de pacientes chagásicos crônicos;
- d) A especificidade da PCR utilizando tanto amostra de soro quanto de sangue foi significativamente semelhante, indicando que o soro pode ser um potencial material biológico para a confirmação da infecção pelo *T. cruzi*.

7 PERSPECTIVAS

- a) Realizar um estudo comparativo através da ferramenta molecular aqui padronizada entre amostras de soro de pacientes chagásicos com a forma cardíaca e com a forma indeterminada, visando um estudo comparativo;
- b) Caracterizar e seqüenciar os produtos amplificados de 120 pb, 360 pb e 600 pb resultantes dos ensaios de PCR com os *primers* TCZ1 e TCZ2 a partir de DNA purificado de amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos, visando conhecer a procedência dos fragmentos amplificados;
- c) Avaliar o desempenho de outros *primers* nucleares na detecção de DNA obtido de amostras de soro de pacientes chagásicos utilizando a PCR padronizada neste trabalho quanto com o protocolo utilizado na PCR com os *primers* nucleares do grupo de Constança Britto (2009).

REFERÊNCIAS

ANDRADE S. G.; MAGALHÃES J. B.; PONTES A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox, in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 63, p. 721-726, 1985.

ANONYMOUS recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p.549-562, 1999.

ÁVILA, H. A. et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polymerase chain reaction amplification of Kinetoplast Minicircle DNA: Comparison with serologic and xenodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.31, n. 9, p. 2421 – 2426, 1993.

ÁVILA, H. A. et al. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 42, p. 175 – 188, 1990.

ÁVILA, H. A. et al. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 211-21, 1991.

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GHUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivos e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.

BASQUIERA, A. L. et al. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and parasitaemia detected by polymerase chain reaction. **Cardiovascular Medicine**, Nova York, v. 89, p. 1186-1190, 2003.

BOCZKO, J. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induced changes in the innervations, structure and function of the murine bladder. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 173, p. 1784-1788, 2005.

BRASIL - Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde-Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.38, supl. 3, 2005.

BRAZ, S. C.; MELO, M. F. A. D.; LORENA, V. M. B.; LORENA, I. M. B.; MOUTINHO, P. T.; VASCONCELOS, R. H. T.; MORAIS, C. N. L.; MELO, F. L.; MELO, A. S. ; SOARES, A. K. A. ; MORAES, A. B. ; SOUZA, W. V. ; GOMES, Y. M. Epidemiological situation of Chagas disease in Pernambuco. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CENTENÁRIO DA DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS, 2009, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro:[S.n.], 2009. 1 CD ROM.

BRENIERE, S. F. et al. Special humoral depression in chronic patients infected by *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 26, p. 245-258, 1984.

BRENIERE, S. F. et al. Association between *Trypanosoma cruzi* zymodemes and specific humoral depression in chronic chagasic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, Londres, v. 83, p. 517, 1989.

BRICEÑO-LEÓN R. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25, n.1, p. S71-S82, 2009.

BRIONES, M. R. et al. The evolution of the two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.104, p.219-232, 1999.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENCE, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 111, p.95-105, 2000.

BRITTO, C. et al. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 1, p. 171-172, 1993.

BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; VANNI, C. M. M. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. **Parasitology**, Londres, v. 110, p.241-247, 1995.

BRITTO, C. et al. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 823-826, 2001.

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 102-135, 2009

BRUTUS, L. et al. Congenital Chagas disease: Diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.106, n. 3, p. 195-199, 2008.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico. In: CANÇADO J. R.; CHUSTER M. **Cardiopatia Chagásica**, Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas. 1985.

CANO, M. I. et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for *Trypanosoma cruzi* Genome Project. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 71, p. 273- 278, 1995.

CASTRO, A. M. et al. Blood culture and polymerase chain reaction for diagnosis of chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, Londres, v. 88, p. 894-900, 2002.

CASTRO, C.; CRAIG, S. P.; CASTANEDA, M.; Genomic organization and ploidy number in *T. cruzi*, **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 4, p. 273-282, 1981.

CASTRO, C. et al. Estudo radiológico longitudinal do esôfago, em área endêmica de doença de Chagas, em um período de 13 anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 27, n. 4, p. 227-233, 1994.

CERISOLA, J. A.; ROHWEDDER, R. W.; PRADO, C. E. Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatomíneos. **Boletín Chileno de Parasitología**, Santiago, v.26, p.57-58, 1971.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 11-80, 1909.

CORRAL, R. S. et al. Purification and Characterization of an 80 Kilodalton *Trypanosoma cruzi* Urinary Antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n 1, p. 141-151, 1989.

COURA, J. R. et al. Morbidade da doença de Chagas em áreas do Sertão da Paraíba e da Caatinga do Piauí. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 29, p. 197-205, 1996.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 129, p. 53-59, 2003.

DEGRAVE, W. et al. Peculiar sequence organization of kinetoplast NA minicircle from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 27, p. 63-70, 1988.

DESQUENCE, M.; DÁVILA, A. M. R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 109, p. 213-231, 2002.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting

population after *in vitro* culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2003.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 5. p. 48-74.

DIAS, J. C.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.41, n.2 p.193-196, 2008.

DIAS, J. C. P. Chagas disease: successes and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 2020-2021, 2006.

DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V.; GONZÁLES, A. An Improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 5, p. 616-623, 1992.

DOCAMPO, R.; BOISO, J. F.; STOPPANI, A. O. Metabolic changes in diskinetoplastic *Trypanosoma cruzi* by ethidium bromide action. **Medicina**, Buenos Aires. v.34, n.5,p. 525-531, 1974.

DUFFY, T. et al. Accurate Real- time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 3, n. 4, p. 1-10, 2009.

FERNANDES, J. V., et al. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 40, n.3, p. 141- 146, 2004.

FERNANDES, O. et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exons and ribosomal RNA sequence. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 58, n. 6, p. 807- 811, 1998.

FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BRITTO, C. Molecular Diagnosis of Chagas Disease. In: Simpósio de Biología Molecular y Enfermedad de Chagas, 2002, Rio de Janeiro. **Mesa Redonda**. Disponível: <http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/md7/md702/fernan.htm>. Acesso em: 24 jul. 2009.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Doença de Chagas. In: _____. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 22. p. 241-249.

FERREIRA, L. F. et al. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 75, p. 79-84, 2000.

FREITAS, J. M. et al. Ancestral genomes sex and population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 2, p. 226-235, 2006.

GARRAUD, O. et al. Measures to prevent transfusion-associated protozoal infections in nonendemic countries. **Transfusion Clinique et Biologique**, Paris, v.5, n.2 p.110-112, 2007.

GOMES, M. L. et al. Clinical, laboratory and epidemiological data of chronic chagasic patients residing in the northwestern region of the State of Paraná, Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 22, n.2, p. 587-592, 2000.

GOMES, M. L. et al. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 60, n. 2, p. 205-210, 1999.

GOMES, M. L. et al. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of Polymerase Chain Reaction for detection in human blood. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque v. 88, p. 28-33, 1998.

GOMES, Y. M. PCR and Sero-Diagnosis of Chronic Chagas's Disease. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 66, n.2, p. 107-119, 1997.

GOMES, Y. M. **Isolement, caracterisation et propriete immunisante d'une proteine (72kDa) ubiquitaire du cycle evolutif de *Trypanosoma cruzi***. 1993. Tese (Doutorado em bioquímica) - Université Pierre et Marie Curie, Paris, 1993.

GOMES, Y. M. Diagnóstico Etiológico. In: MALTA J. (Org). **Doença de Chagas**. São Paulo: Savier, 1996. p. 119-132.

GONTIJO, E. D. et al. Triagem Neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 243-254, 2009.

GONZÁLEZ, A. et al. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.81,p. 3356-3360, 1984.

GRIJALVA , M. J. et al. Blood donors in a vector-free zone of Ecuador potentially infected with *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 360-363, 1995.

GUHL, F. et al. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. **Lancet**, Londres, v. 349, p. 1370, 1997.

GUHL, F. et al. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. **American Journal of Physical Anthropology**, Hoboken, v.108, n. 4, p. 401-407, 1999.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. Interruption of Chagas disease transmisión in the Andean Countries: Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 413-415, 1999.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.12, p. 108-114, 1996.

HERRERA, L. et al. Cornea as a tissue reservoir of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, Londres, v.100, p.1395-1399, 2007.

HOTEZ, P. et al. Neglected tropical diseases and HIV/AIDS. **Lancet**, Londres, v. 368, n. 9550, p. 1865-1866, 2006.

HUGGINS, D. W.; MALTA, J.; MEDEIROS, L. B. Quadro Clínico: Fase Aguda. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996. cap. 4, p. 39-42.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 69, n. 10, p. 2904-2909, 1972.

JONES, E. M. et al. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 48, n. 3, p. 348-57, 1993.

JUNQUEIRA, A. C. V.; CHIARI, E.; WINKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in endemic region of north-eastern Brazil. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, Londres, v. 90, p. 129-132, 1996.

JUNQUEIRA, A. C. V.; DEGRAVE, W.; BRANDAO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 270-272, 2005.

KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas' disease) – a tropical disease now in the United States. **The New England Journal of Medicine**, Melbourn, v. 329, p. 639-644, 1993.

KIRCHHOFF, L. V. et al. Comparison of PCR and Microscopic Methods for Detecting *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 5, p.1171-1175, 1996.

KIRCHHOFF, L. V. et al. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. **Transfusion**, Filadelfia, v. 46, n. 2, p.298-304, 2006.

KIRCHHOFF, L. V.; PEARSON, R. D. The emergence of Chagas disease in the United States and Canada. **Current Infection Disease Reports**, Filadelfia, v. 9, n. 5, p. 347-350, 2007.

KLINGBEIL, M. M.; ENGLUND, P. T. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 13, p. 4333-4334, 2004.

LACUNZA, C. D. et al. Use of Polimerase Chain Reaction (PCR) for early evaluation of etiological treatment in Young adults, chronically infeted with *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 3, p. 227-232, 2006.

LAINSON, R; SHAW, J. J.; NAIFF, R. D. Chagas' disease in the Amazon Basin: speculation on transmission *per os*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 22, p. 62-67, 1980.

LANAR, D. E.; LEVY, S. C.; MANNING, J. E. Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 3, p. 327-341, 1981.

LUQUETTI, A. O. Megaesôfago e anticorpos anti *Trypanossoma cruzi*. **Revista Goiana de Medicina**, Goiânia, v. 33, p. 1-16, 1987.

LUQUETTI, A. O. et al. Performance levels of four latin American laboratories for the serodiagnosis of Chagas disease in Mexican sera samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 5, p. 797-800, 2009.

LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Disgnóstico laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. (Org). **Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 17. p. 344-378.

MC DANIEL, J. P.; DVORAK, J. A. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 57, p. 213-222, 1993.

MACEDO, A. M. et al. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 55, p. 147-154, 1992.

MALTA, J. Quadro Clínico: Fase Crônica – Forma Cardíaca. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996. cap. 4, p. 70-79.

MARCON, G. E. et al. Use of a nested polymerase chain reaction (NPCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, Nova York, v.43, n. 1, p. 39-43, 2002.

MARIN, L. J. et al. Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semiquantitativo utilizando plasmídeo clonado com parte do gene α B de citomegalovírus. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.35, p. 85-94, 2002.

MELO, A. S. et al. Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue no estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.31, n 2, p.69-73, 2009.

MELO, F. L. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em pcr para a detecção de *Schistosoma mansoni***. 2006. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2006

MELO, M. F. A. D. et al. Comparing the effectiveness of three methods for obtaining *Trypanosoma cruzi* DNA from serum of chronic chagasic patients. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CENTENÁRIO DA DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS, 2009, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: [S. n.], 2009. 1 CD ROM.

MESQUITA, R. A. et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n.4, p. 314-319, 2001.

MILES, M. A. et al. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. **Nature**, Londres, v. 272, p. 819-821, 1978.

MIYAMOTO, C. T. et al. *Trypanosoma cruzi*: Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in blood of mice infected with different clonal genotypes. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque, v. 112, p. 198-201, 2006.

MOLYNEUX, D. H.; MOREL, C. Onchocerciasis and Chagas' disease control: the evolution of control via applied research through changing development scenarios. **British Medical Bulletin**, Londres, v. 54, p. 327-339, 1998.

MORA, M. C. et al. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 6, p. 1468-1473, 2005.

MOREL, C. et al. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircle. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 77, n. 11, p. 6810-6814, 1980.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 7, p. 1477-1482, 1989.

MOUTINHO, P. T. ; MELO, M. F. A. D. ; BRAZ, S. C. ; LORENA, I. M. B. ; LORENA, V. M. B. ; NAKAZAWA, M. ; MELO, M. G. A. ; MELO, F. L. ; BRITTO, C. F. D. P. C. ; GOMES, Y. M. Avaliação do desempenho de dois métodos de extração de DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos. In: XLV-Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009, Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42. p. 153-153, 2009.

NAVA, A. et al. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagas' disease. **Archivos de Cardiologia de México**, México, v. 71, p. 199-205, 2001.

NOBREGA, A. A. et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of Açaí palm fruit, Brazil. **Emerging Infection Disease**, Atlanta, v.15, n. 4, p. 653-655, 2009.

OLIVEIRA FILHO A. M. Differences of susceptibility of five triatomine species to pyrethroid insecticides- implications for Chagas disease vector control. **Memória de Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 425- 428, 1999.

OLIVEIRA, R. P. et al. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 3776-3780, 1998.

OLIVEIRA, R. P. et al. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. **Memória de Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 65-70, 1999.

PONCE C. Hacia la eliminacion de la transmision del *Trypanosoma cruzi* en Honduras y los paises de America Central. **Medicina**, Buenos Aires, v. 59, p. 117-119, 1999.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 107-115, 2003.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, New York, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

RAMIREZ, L. E. et al. Primeira evidencia de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 31, p. 143-148, 1997.

REQUENA, J. M. et al. Characterization of a highly repetitive interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 51, p. 271-280, 1992.

REYES, M. B. et al. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 7, p. 2846-50, 1990.

RUSSOMANDO, G. et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polimerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 3, p. 487-491, 1998.

RUSSOMANDO, G. et al. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 11, p. 2864-8, 1992.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of β - globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SANTOS, M. R. M. et al. The *Trypanosoma cruzi* Genome Project: Nuclear Karyotype and Gene Mapping of Clone CL Brener. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 6, p. 821-828, 1997.

SCHEINERT, P.; BEHRENS, B.; KAHLE, D. **Optimizing DNA Amplification Protocols using the Eppendorf® Mastercycler®**. Eppendorf North America. Washington, 2003. Disponível em:
http://www.eppendorfna.com/applications/PCR_appl_protocolsMC.asp. Acesso em: 3 nov. 2005.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n.1, p. 75-85, 2007.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Possible oral transmission of actue Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 351-357, 1991.

SILVEIRA, J. F. *Biologia Molecular do Trypanosoma cruzi* In: BRENER, Z. e ANDRADE, Z. (Ed). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 8, p. 127- 147.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. **Annual review of microbiology**, California, v. 41, p. 363-382, 1987.

SIMPSON, L. et al. Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 13, p. 6182-6196, 1987.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of ribosomal RNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 62, p. 45-52, 1993

STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil, **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, Nova Iorque, v. 60, n. 1, p.25-32, 2007.

STOBBAERTS, E. Doença de Chagas é a mais esquecida que todas as doenças negligenciadas. **Diário da saúde**, Rio de Janeiro, 22 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=doenca-chagas-mais-esquecida-todas-doencas-negligenciadas&id=4333>>. Acesso em: 07 dez. 2009.

STURM, N. R. et al. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 33, p. 205-214, 1989.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. Problemática vetorial da Doença de Chagas. **Arquivos de Ciência da Saúde**, São José do Rio Preto, v.11, n. 1, p. 44-47, 2004.

TIBAYRENC, M; AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **TRENDS in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 405-410, 2002.

TIBAYRENC, M. et al. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Paraty between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 1335-1339, 1993.

TYBAYRENC, M. et al. Natural population of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 83, p 115-119, 1986.

VAGO, A. R. et al. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **The American Journal of Pathology**, Filadelfia, v.149, p.2153–2159, 1996.

VALENTE, S. A. S. Epidemiologia da transmissão oral da doença de Chagas. Exposição na Mesa Redonda *Situação atual da doença de Chagas na Amazônia*. **XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Florianópolis, 2005.

VALENTE, S. A. S. et al. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas' disease in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n. 1, p.395-398, 1999.

VALLEJO, G. A. et al. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 72, p. 203-212, 1999.

VIRREIRA, M. et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, n.5, p. 574-582, 2003.

WAGNER, W.; SO, M. Genomic Variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of multicopy genes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 58, n. 10, p. 3217-3224, 1990.

WINCKER, P. et al. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 51, p. 771-777, 1994a.

WINCKER, P. et al. High correlation between Chagas disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. **FEMS Microbiology Immunology**, Amsterdam, v. 124, n. 3, p. 419-423, 1994b.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet Infectious Diseases**, Boston, v.4, p. 337-348, 2004.

ZHANG, Q; TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Linkage dis-equilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi* (flagellate), the agent of Chagas disease. **The Journal of Protozoology**, Nova Iorque, v. 35, p. 81-85, 1988.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n.7, p. 1051-1054, 2009.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE

Título de projeto: Avaliação da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Trypanosoma cruzi* em soro e em sangue de pacientes com doença de Chagas crônica

Eu, _____, Brasileiro(a), RG _____, residente a
_____ Bairro _____ CEP _____

Cidade _____, Estado _____ Tel _____, aceito participar desse estudo, cujo objetivo é avaliar a metodologia de diagnóstico da doença de Chagas, utilizando um método que detecta o parasita causador da doença. Esse método chama-se Reação em Cadeia da Polimerase que tem como sigla PCR e detecta parte do parasita. Fui informado que serão coletados 10mL do meu sangue, o que equivale a uma colher e meia de sopa, através de tubos com EDTA (uma substância que não coagula o sangue) e sem EDTA, adaptados a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor pela picada da agulha. Fui informado também que o meu sangue será utilizado como controle positivo de fase crônica da doença para a otimização da técnica em estudo e que o material coletado será incorporado ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, podendo ser utilizado em outras pesquisas futuras. Fui informado ainda que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa, e que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão. Não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo. Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do responsável da pesquisa e outra comigo. O pesquisador responsável se comprometeu em informar a médica Dra. Maria da Glória sobre o resultado do meu exame.

O benefício em participar desse projeto é que irei contribuir com o desenvolvimento de uma metodologia para diagnosticar a doença de Chagas com mais rapidez.

Atesto que entendi o conteúdo deste termo de consentimento livre e esclarecido, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo. Atesto que esclareci todas as minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

Pesquisador Responsável: Yara de Miranda Gomes, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Tel. 81-2101-2559; 81-9433-1312. Contato com o CEP/CPqAM: comitedeetica@cpqam.fiocruz.br; Tel 81-2101-2639

Recife, ____/____/____.

Assinatura do paciente

Confirmo ter dado todas explicações ao paciente sobre os objetivos e o tipo de estudo.

Assinatura e carimbo do médico
Dra. Maria da Glória Cavalcanti
81-2101-1441/ 81-9976-5398

Testemunha

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA INDIVÍDUO NÃO PORTADOR DA DOENÇA DE CHAGAS

Título de projeto: Avaliação da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Trypanosoma cruzi* em soro e em sangue de pacientes com doença de Chagas crônica

Eu, _____, Brasileiro(a), RG _____, residente a _____ Bairro _____ CEP _____ Cidade _____, Estado _____ Tel _____, aceito participar desse estudo, cujo objetivo é avaliar a metodologia de diagnóstico da doença de Chagas, utilizando um método que detecta o parasita causador da doença. Esse método chama-se Reação em Cadeia da Polimerase que tem como sigla PCR e detecta parte do parasita. Fui informado que serão coletados 10mL do meu sangue, o que equivale a uma colher e meia de sopa, através de tubos com EDTA (uma substância que não coagula o sangue) e sem EDTA, adaptados a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor pela picada da agulha. Fui informado também que o meu sangue será utilizado como controle negativo de fase crônica da doença para a otimização da técnica em estudo e que o material coletado será incorporado ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, podendo ser utilizado em outras pesquisas futuras. Fui informado ainda que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa, e que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão. Não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo. Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do responsável da pesquisa e outra comigo. O pesquisador responsável se comprometeu em informar a médica Dra. Maria da Glória sobre o resultado do meu exame. E caso o resultado seja reagente, a amostra do meu sangue será testada no Serviço de Referência em Doença de Chagas do centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz. Confirmando a positividade do diagnóstico eu serei encaminhado ao Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco-HUOC.

O benefício em participar desse projeto é que irei contribuir com o desenvolvimento de uma metodologia para diagnosticar a doença de Chagas com mais rapidez.

Atesto que entendi o conteúdo deste termo de consentimento livre e esclarecido, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo. Atesto que esclareci todas as minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

Pesquisador Responsável: Yara de Miranda Gomes, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Tel. 81-2101-2559; 81-9433-1312. Contato com o CEP/CPqAM: comitedeetica@cpqam.fiocruz.br; Tel 81-2101-2639

Recife, ____/____/____.

Assinatura do paciente

Confirmo ter dado todas explicações ao paciente sobre os objetivos e o tipo de estudo.

Assinatura e carimbo do médico
Dra. Maria da Glória Cavalcanti
81-2101-1441/ 81-9976-5398

Testemunha

APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Departamento de Imunologia – Laboratório de Imunoparasitologia

Projeto: Avaliação da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Trypanosoma cruzi* em soro e em sangue de pacientes com doença de chagas crônica.

Responsáveis: Yara M. Gomes, Constança Britto e Myllena Melo.

1. Nome: _____
Prontuário n°: _____ Registro CPqAM: _____
Data da coleta: _____

2. Sexo: (1) Feminino (2) Masculino

3. Idade: _____ (1) De 0 a 12 anos (2) De 13 a 19 anos (3) De 20 a 59 anos (4) A partir de 60 anos (9) IGN
4. Situação trabalhista: (1) Empregado (2) Desempregado (3) Aposentado (4) Do lar (5) INSS (9) IGN

Endereço: _____
Bairro: _____ Município: _____ Estado: _____
____ Telefone: (____) - _____ Celular: (____) - _____

5. Município de nascimento: _____ Estado: _____

6. Forma de contaminação: (1) Vetorial (2) Transfusional (3) Congênita (4) Oral (5) Transplante de órgão (6) Acidente de laboratório (9) IGN

7. Exames clínicos convencionais:

RX coração: (1) normal (2) dilatação
ECG: (1) normal (2) anormal
RX esôfago (1) normal (2) dilatação
Enema opaco: (1) normal (2) dilatação

8. Sorologia:

IFI: (1) positivo (2) negativo
HAI: (1) positivo (2) negativo
ELISA: (1) positivo (2) negativo

9. Forma clínica crônica: (1) Forma cardíaca (2) Forma digestiva (3) Forma indeterminada (4) Forma mista

10. Tempo de doença (ano): (1) 1 a 5 (2) 6 a 10 (3) 11 a 15 (4) 16 a 20 (5) 21 a 25 (6) 26 a 30 (7) > 30 (9) IGN

11. Medicação: (1) Sim - ano: _____ (2) Não

APÊNDICE D – ARTIGO EM PREPARAÇÃO

AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA DETECÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM SORO E EM SANGUE DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Melo MFAD¹, Lorena VMB¹, Lorena IMB¹, Braz, SC¹, Tenório, PM¹, Melo, FL¹, Cavalcanti, MG² Rodrigues AC³, Britto, CPDF³, Gomes YM¹

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/Fiocruz, Recife-PE, ²Hospital Oswaldo Cruz – HUOC/Universidade de Pernambuco/UPE, Recife-PE, ³Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ.

Correspondência para: Yara M. Gomes, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil. Fax: 55-81-34532449, Phone: 55-81-2101-2559. email: yara@cpqam.fiocruz.br

RESUMO:

No presente trabalho, objetivou-se utilizar a ferramenta da biologia molecular, indicada pelo Ministério da Saúde como diagnóstico confirmatório da doença de Chagas, a PCR, utilizando amostras de soro como um potencial meio de extração de DNA do parasito. Para isso, foram coletadas amostras de sangue e soro de 65 pacientes chagásicos (FC=39, FM=10, FD= 5, FI=9 e IGN=2), selecionados no Ambulatório de Doença do Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Todos os pacientes foram avaliados clinicamente e realizaram exames confirmatórios para infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, também foram coletadas amostras de 35 indivíduos não chagásicos (indivíduos não-chagásicos de área endêmica=9 e indivíduos não chagásicos de área não endêmica = 26) que apresentaram sorologia negativa para infecção pelo *T. cruzi*. 25% dos pacientes chagásicos eram provenientes da microrregião da Mata Setentrional e 55,4% se encontravam na faixa de 20 a 59 anos, sendo 60% do sexo feminino. Ocorreu predominância da forma cardíaca (60%) entre os portadores da infecção pelo *T. cruzi*. As amostras de DNA purificado a partir de amostras de sangue e soro dos pacientes chagásicos crônicos e não chagásicos foram aplicadas na técnica de PCR com a finalidade de avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica, como também a concordância dos resultados. Os resultados da técnica utilizando amostras de soro alcançaram uma sensibilidade (61,3%) superior em relação a amostra de sangue (41,5%). Quando analisado o resultado utilizando as amostras simultaneamente (sangue e soro), o valor da sensibilidade aumentou para 78,5%, sendo estatisticamente semelhante ao obtido com o soro e, diferente com o sangue. O resultado da estatística mostrou que não existiram diferenças entre as especificidades analisadas. A concordância observada foi de 77,9% (sendo considerada “boa”) apenas com amostras de soro. Portanto, a técnica de PCR aqui padronizada, por apresentar fácil leitura dos resultados, é um potencial método molecular a ser aplicado em laboratórios de diagnóstico para confirmação de resultados inconclusivos, segundo recomendação do Ministério da Saúde.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular; PCR; Doença de Chagas.

INTRODUÇÃO:

A doença de Chagas foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas (CHAGAS, 1909), e completou cem anos de descobrimento ano passado (2009), ainda hoje é a doença mais negligenciada do mundo, os indicadores mostram que do montante de investimentos de iniciativas públicas e privadas apenas 0,25% é destinada a doença de Chagas, além de que há 30 anos foram desenvolvidos quase 2000 medicamentos, sendo apenas 21 para outras doenças da lista de doenças negligenciadas e nenhum para a doença de Chagas (HOTEZ et al., 2006; STOBBAERTS, 2009).

A infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, ainda representa um grande problema de saúde pública em 15 países endêmicos. A enfermidade é circunscrita à América Latina, onde se estima que a prevalência da infecção humana seja de cerca de 12 milhões de casos e que cerca de 28 milhões de pessoas estejam sob o risco de infecção (DIAS et al., 2008).

Outros países da Europa e os Estados Unidos da América apresentam casos de infecção através da transmissão transfusional (KIRCHHOFF, 1993; KIRCHHOFF et al., 2006; GARRAUD et al., 2007; KIRCHHOFF, PEARSON 2007; SCHUMUNIS, 2007) como consequência da imigração de indivíduos latinos americanos oriundos de regiões endêmicas para Chagas.

No Brasil, a prevalência da infecção por *T. cruzi* em gestantes se encontra na faixa entre 0,3 a 33% (GONTIJO et al., 2009), justificando a pesquisa da infecção pelo *T. cruzi* nos exames pré-natais e em recém-nascidos filhos de mães chagásicas. Além disso, nesse país, várias ocorrências recentes de surtos por transmissão oral têm sido documentadas, estando geralmente relacionadas a presença de vetores e/ou reservatórios infectados nas imediações do evento (LAINSON et al., 1980; SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; VALENTE et al., 1999; VALENTE, 2005), levantando a preocupação sobre o ressurgimento da doença no Brasil nos próximos anos.

Considerando que não se dispõem, na rotina laboratorial, de métodos sorológicos e parasitológicos com altas especificidade e sensibilidade que possam

avaliar a infecção chagásica em ambas as fases da doença, utilizando amostras de soro, este trabalho propõe avaliar um método molecular para detecção do DNA de *T. cruzi*, que possa ser utilizado durante a fase crônica da infecção, assim como para o diagnóstico de fase aguda e em casos de infecção congênita.

Um exemplo dessas abordagens moleculares é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que apresenta uma alta sensibilidade e especificidade na amplificação de seqüências tanto de DNA do cinetoplasto quanto DNA nuclear de *T. cruzi* (MOSER et al., 1989; STURM et al., 1989; BRITTO et al., 1993; DIAZ et al., 1992; BRITTO et al., 1995; GOMES et al., 1998). Uma grande vantagem desta técnica é a obtenção dos resultados em tempo mínimo, em contrapartida aos métodos parasitológicos indiretos, que apresentam seus resultados após semanas ou até meses (LUQUETTI, RASSI, 2000; YANG & ROTHMAN, 2004). Outras vantagens da PCR são sua simplicidade de execução, além da possibilidade de repetição dos testes em caso de resultados duvidosos, uma vez que esta técnica utiliza pequenos volumes do material clínico (MARIN et al., 2002; YANG & ROTHMAN, 2004).

Com o intuito de tentar aperfeiçoar o diagnóstico da doença de Chagas e assim definir um método molecular que apresente elevadas sensibilidade e especificidade, vários grupos de pesquisa tentam avaliar a PCR como a técnica de diagnóstico para neonatos nascidos de mães chagásicas, indivíduos suspeitos de contaminação oral e principalmente confirmar os diagnósticos inconclusivos gerados pelos testes sorológicos (RUSSOMANDO et al., 1998; VIERREIRA et al., 2003).

Com o advento da PCR, a identificação de seqüências-alvo do *T. cruzi* em material biológico proveniente de indivíduos infectados na fase crônica da doença, e até mesmo em amostras degradadas tem sido demonstrada (AVILA et al., 1991; BRITTO et al., 1993; WINCKER et al., 1994 (a); MARIN et al., 2002; YANG & ROTHMAN, 2004). A literatura relaciona diversos materiais biológicos que podem ser usados como fonte de obtenção de DNA de *T. cruzi*, incluindo tecidos parafinados (biopsias), que datam de mais de 40 anos. Através da análise desses materiais consegue-se relacionar o patógeno com as alterações encontradas em alguns órgãos (FERNANDES et al., 2004; BAREA et al., 2004; MESQUITA et al., 2001). A técnica de PCR possibilitou a amplificação de DNA de *T. cruzi* em amostras de múmias humanas com mais de 4000 anos, confirmando a antiguidade da doença de Chagas (GUHL et al., 1997, 1999; FERREIRA et al., 2000). Isto demonstra a

eficiência dessa abordagem na identificação de DNA de *T. cruzi* em amostras arqueológicas que não passaram por processos químicos de conservação.

Comumente a amostra utilizada para amplificação do material genético do parasito pelo método de PCR é quase sempre o sangue total. Uma das dificuldades em inquéritos epidemiológicos é a coleta do material em áreas bastante distantes dos laboratórios onde serão processadas e analisadas. Contudo, Ávila et al., (1991) desenvolveram uma técnica eficiente de preservação do sangue total para posterior utilização em PCR, misturando-o a uma solução de Guanidina-EDTA. Porém, esta metodologia acarreta um aumento em mais uma etapa do processo, além deste composto poder apresentar inibidores da PCR reduzindo assim sua sensibilidade de detecção do parasito (KIRCHHOFF et al., 1996).

Uma grande perspectiva para o diagnóstico molecular da infecção é a detecção do DNA em soro de pacientes chagásicos. A literatura demonstra que não existem diferenças significativas entre o uso de amostras de soro e sangue total (RUSSOMANDO et al., 1992). Além disso, haveria a facilidade de utilizar uma mesma amostra coletada para diagnóstico sorológico, método de escolha de diagnóstico indicado pelo Ministério da Saúde. Sendo desta forma, o soro pode vir a ser um potencial meio de extração de DNA do parasito para o diagnóstico molecular da doença de Chagas. É por meio desta abordagem que o presente trabalho avaliou a eficácia da técnica de PCR na detecção de DNA de *T. cruzi* a partir de amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos crônicos, utilizando seqüências nucleares repetitivas o parasito como alvo de amplificação.

METODOLOGIA

PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PCR

Alíquotas contendo aproximadamente 1×10^8 a $1,9 \times 10^8$ tripomastigotas/vial, obtidas de cultura celular, foram utilizadas durante a padronização da PCR. O DNA das formas tripomastigotas foi purificado através do *kit* da marca “QIAamp DNA Blood Mini Kit” (Qiagen®) e a quantidade de DNA utilizada partiu de diluições seriadas (10 ng, 5 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 1 pg, 0,1 pg, 0,01 pg, 1,5 fg, 1 fg, 0,5 fg, 0,25 fg) com a finalidade de obtenção de uma curva de limite de detecção da reprodução do protocolo de Moser et al., (1989) e Russomando et al., (1992). Por

serem autores responsáveis pelo desenho dos *primers* nucleares, TCZ1 – 5' CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT e TCZ2 – 5' CCTCCAA-GCAGCGGATAGTTCAGG, e os segundos por terem utilizado amostras de soro de pacientes chagásicos. Após a escolha do protocolo, as quantidades de 2,5 µL (25 pmol por reação) e 5 µL (50 pmol por reação) de cada *primer* e a quantidade de taq polimerase platinum (2,5U), como o número de ciclos (35 e 40) também foram padronizados, com a finalidade de ajustar a sensibilidade da técnica em detectar DNA de *T. cruzi* em amostras de pacientes chagásicos crônicos.

Após a escolha do protocolo e o ajuste dos reagentes e das condições de ciclagem, a fim de que a técnica alcançasse o objetivo do trabalho, foi possível aplicar o ensaio molecular utilizando DNA recuperado de amostras de sangue e soro obtidas de pacientes chagásicos crônicos, os quais foram inicialmente selecionados por dois testes ELISA (ELISA-convencional da marca ABBOT (CHAGAS TEST ELISA III) e o ELISA-recombinante da marca WAMA Diagnóstica (Imuno-Elisa CHAGAS). As amostras clínicas foram extraídas com o *kit* supracitado da marca Qiagen®.

A análise das amostras frente ao protocolo padronizado necessitou de alguns ajustes tanto em relação às condições de ciclagem, como também às concentrações dos reagentes empregados. Desta forma, foi realizada a otimização da PCR para seu uso clínico com amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos crônicos. Para isso, o gradiente de temperatura foi realizado, sendo selecionada uma faixa de temperatura que variou de 55,7°C a 57,8°C. Também foram testadas diferentes concentrações de DNA obtido a partir de amostras de sangue de dois pacientes confirmadamente chagásicos, com a finalidade de verificar se houve alteração no perfil de produtos gerados pela amplificação por PCR.

Foi avaliada a eficácia do ensaio de PCR utilizando amostras de soro, diferentes concentrações de *primers* foram testadas: 20 pmol, 15 pmol e 10 pmol por reação, utilizando DNA obtido de cinco pacientes chagásicos, mantendo as concentrações dos demais compostos da reação.

Por fim, após modificações do protocolo das condições de ciclagem e reagentes, foi avaliado o limite de detecção do ensaio padronizado. Para isso foram realizados experimentos de reconstituição, empregando-se amostras de soro e sangue de indivíduo não chagásico contendo concentrações decrescentes de células de *T. cruzi*, a partir do fator 10 iniciando com 10³ e finalizando com zero

parasito, sendo a amostra tanto de sangue quanto de soro, o diluente. O DNA das amostras reconstituídas foi recuperado por extração com o *kit* da marca Qiagen®, segundo as especificações do fabricante.

DETECÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS EM GEL DE AGAROSE

Dez microlitros de produto da PCR foram aplicados em gel de agarose (BioAgency®) a 2% em tampão Tris Acetato EDTA (TAE) 1X contendo brometo de etídeo (10 mg/mL). Após a corrida eletroforética, os fragmentos foram visualizados através da exposição à luz ultravioleta com auxílio do transluminador UV (modelo 60648 da marca Cole Parmer®) e fotodocumentados utilizando o equipamento *Gel Logic 100 Imaging System* da Kodak®.

POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram coletados 5 mL de soro e 5 mL de sangue periférico pelo sistema Vacutainer® de sessenta e cinco pacientes chagásicos previamente selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) da Universidade de Pernambuco (UPE) no período de março/2008 a julho/2009. Também foram selecionados trinta e cinco indivíduos não chagásicos, sendo nove acompanhantes dos pacientes de área endêmica e 26 de área não endêmica (região metropolitana).

Para confirmação do diagnóstico sorológico foram utilizados 2 testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas distintas: ELISA-convencional da marca ABBOT (CHAGAS TEST ELISA III) e o ELISA-recombinante da marca WAMA Diagnóstica (Imuno-Elisa CHAGAS), seguindo as instruções dos fabricantes.

As amostras chagásicas do estudo foram avaliadas de acordo com a faixa etária, sexo, formas clínicas da doença e também de acordo com o local de nascimento.

QUESTÕES ÉTICAS

Os pacientes chagásicos e indivíduos saudáveis envolvidos neste estudo tiveram participação voluntária, assinando o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e responderam a um formulário de pesquisa. A conduta de inclusão dos

mesmos e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz.

EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

O DNA foi extraído das amostras de soro e sangue de pacientes chagásicos crônicos e dos indivíduos não chagásicos utilizando o *kit* “QIAamp DNA Blood Mini Kit” (Qiagen®). O DNA recuperado de sangue foi eluído em um volume de 80 µL, e em 50 µL no caso das amostras de soro. O material foi armazenado à - 20° C para posterior utilização na PCR.

DOSAGEM DE DNA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS COM O KIT QIAGEN®

Para avaliar a concentração do DNA, o material obtido de amostras de sangue e soro foi analisado quanto a sua concentração através de espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda em 260nm/280nm.

APLICAÇÃO DA PCR PARA A DETECÇÃO DE DNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM AMOSTRAS DE SANGUE E DE SORO

Os ensaios de PCR foram realizados em volume final de 50 µL, nas seguintes condições de reação: 2 µL (10 pmol/µL) de cada *primers* TCZ1 e TCZ2, 1X Tampão da Taq Polimerase contendo 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µL da enzima Taq Polimerase Platinum (5 U/µL) (Invitrogen), 2 mM de dNTPs, 5 µL de DNA de sangue ou 10 µL de DNA de soro. A ciclagem utilizada foi realizada segundo Moser et al., (1989) com alterações quanto à quantidade de ciclos e temperatura de anelamento, como demonstrado na seção de resultados.

Para cada ensaio de PCR foi adicionada uma amostra soronegativa para a infecção chagásica, além de um controle branco (amostra contendo todos os reagentes e água ao invés do DNA), e um controle positivo (0,1 pg de DNA genômico de *T. cruzi*). Todas as pipetas foram separadas conforme a sua utilidade, a fim de se evitar riscos de contaminação entre amostras e por produtos previamente amplificados (amplicons).

Além disso, todas as amostras que apresentaram resultados negativos na amplificação de DNA de *T. cruzi* utilizando os primers TCZ1 e TCZ2, foram testadas através de outro ensaio de PCR utilizando iniciadores que são específicos para a

seqüência humana da β -globina, PC03 (5' ACACAACACTGTGTTCACTAGC 3') e PC04 (5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3').

ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS

Os resultados dos ensaios da PCR foram analisados por duas pessoas que desconheciam a reatividade das amostras. Estas analisaram cada gel fotodocumentado separadamente, avaliando a presença ou ausência do fragmento de DNA específico de *T. cruzi*. A análise de concordância entre os observadores foi baseada na avaliação do indicador *kappa* (*k*), segundo Andrade e Zicher (1997). A sensibilidade e especificidade dos ensaios de PCR foram estimadas de acordo com Ferreira e Ávila (2001), e para avaliação foi empregado o teste de *two proportion* do software *MINITAB 15*, e para análise dos dados de formas clínicas, idade e sexo foram utilizados os softwares R - 2.9.0 e EPI 6. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PCR

Inicialmente, foram reproduzidos os protocolos de PCR escolhidos. Após corrida eletroforética dos produtos amplificados, o fragmento de 188 pb (seta em vermelho) correspondente às seqüências satélites repetitivas presentes em torno de 120.000 cópias no genoma nuclear de *T. cruzi*, pôde ser detectado até a diluição correspondente a 0,1 pg de DNA, utilizando o protocolo de Moser et al., (1989) (Figura 1), e até 1 pg quando foi empregado o protocolo de Russomando et al., (1992) (Figura 2).

Dada à sensibilidade 10X maior observada com o protocolo de Moser et al., (1989) em relação ao de Russomando et al., (1992), utilizando concentrações decrescentes de DNA de *T. cruzi*, optou-se por usar o primeiro método como referência para os ensaios de otimização das concentrações de reagentes utilizados na PCR.

A Figura 3 mostra o resultado do teste da concentração de *primers* baseado no protocolo de Moser et al., (1989), utilizando 25 ciclos de amplificação e 2,5U de Taq polimerase. Obteve-se uma detecção mais refinada quando utilizados 25 pmol de cada *primer* por reação, alcançando um limite de detecção de 0,01 pg ou 10 fg de

DNA (Figura 3A), enquanto que utilizando 50 pmol por reação, o limite foi 10X menor, 0,1 pg (Figura 3B).

O número de ciclos para as temperaturas de desnaturação, anelamento, e extensão foi avaliado. Alterações no protocolo de Moser et al., (1989) foram realizadas, aumentando de 25 para 35 e 40 ciclos de amplificação. Apesar de ambas as ciclagens fornecerem o mesmo limite de detecção observado nos experimentos prévios de padronização da técnica (0,01 pg ou 10 fg de DNA) (Figura 4, linha 5 e figura 5, linha 5), optou-se por realizar 35 ciclos de amplificação nos ensaios diagnósticos com amostras clínicas.

De acordo com a literatura, torna-se necessário estabelecer a temperatura ótima de anelamento dos *primers* com a seqüência alvo, a fim de gerar um ensaio de PCR específico e garantir assim, a credibilidade do teste diagnóstico a ser aplicado nas amostras de soro e sangue de indivíduos chagásicos e não-chagásicos. Para tal, na tentativa de melhorar a especificidade de anelamento empregando amostras clínicas, foi realizado um ensaio de PCR com gradiente de temperaturas a partir de amostras de sangue reconstituídas, as quais foram misturadas com 0,1 pg de DNA de *T. cruzi* (Figura 6). A temperatura que apresentou melhor desempenho ficou entre 55,7°C e 56,5°C, sendo escolhida a temperatura de 56°C.

Após a seleção da temperatura de anelamento, e comparando o perfil de bandas geradas entre as amostras de sangue reconstituídas e aquelas correspondentes ao DNA purificado de *T. cruzi*, ainda observa-se a presença de fragmentos inespecíficos provenientes da amplificação de DNA de sangue humano (Figura 6). Na tentativa de obter uma melhor definição para o padrão de bandas geradas, foram realizados ensaios com quantidades menores de DNA obtido de duas amostras de sangue que foram soropositivas para Chagas: amostra HUOC 193 (13,5 ng e 27 ng) e amostra HUOC 220 (79,5 ng e 159 ng). Porém, mesmo diminuindo a quantidade de DNA por reação, foi possível observar o mesmo perfil de bandas inespecíficas e a ausência do fragmento de 188 pb correspondente às seqüências satélites nucleares do parasito. Na Figura 7, pode-se visualizar os três fragmentos de aproximadamente 120, 300 e 600 pb nas linhas 1 a 4 (DNA extraído de amostras de sangue de pacientes chagásico) e no controle positivo (CP) referente ao DNA de tripomastigotas de *T. cruzi*, observa-se a presença do

fragmento específico de 188 pb, além de outra banda de maior peso molecular (em torno de 360 pb).

Em relação à aplicação da técnica em amostras de soro, o primeiro passo foi ajustar a concentração de *primers*, a fim de evitar a formação de dímeros que pode ocorrer devido ao seu excesso na reação. De acordo com a figura 6, foi escolhida a concentração de 20 pmol por reação, considerando que houve uma diminuição da sensibilidade de detecção quando foram testadas concentrações menores correspondentes a 15 e 10 pmol, em amostras de soro de pacientes chagásicos. Isso pode ser observado quando comparadas as linhas 2 e 7 da figura 8.

A competição dos *primers* em se anelar a outras seqüências de DNA ficou bem evidenciada ao analisar os resultados obtidos para a determinação do limite de detecção, onde se empregou amostras de sangue de indivíduos soronegativos contendo concentrações decrescentes de células de *T. cruzi* (diluições seriadas com fator 10, variando de 10^3 a 0 parasitos). Na figura 9, pode ser observado que à medida que se diminui a concentração de células do parasito, os fragmentos amplificados tornam-se mais bem definidos, realçando os fragmentos específicos de 188 pb e 360 pb. O limite de detecção alcançado foi relacionado à diluição equivalente a 10^{-1} parasitos (linha 5). Considerando que um único parasito contém aproximadamente 300 fg de DNA, foi possível detectar até 30 fg de DNA de *T. cruzi* misturado em sangue. Um dado importante na figura 9 é a visualização do fragmento com aproximadamente 600pb, apenas observado quando a quantidade de DNA de *T. cruzi* se torna mais escassa dentro da amostra de sangue (linhas 5 e 6) sendo presente também no controle de DNA obtido de amostra de sangue de indivíduo não chagásico (linha CN).

Em relação às amostras de soro, constatou-se que não houve diminuição da sensibilidade de detecção empregando amostras de soro reconstituídas contendo as mesmas diluições de DNA de *T. cruzi* usadas para os ensaios com sangue, isto é, obteve-se com soro o mesmo limite de detecção alcançado com sangue, equivalente a 10^{-1} parasitos (Figura 10, linha 3).

Considerando que as bandas de 188 pb e/ou a de aproximadamente 360 pb estão presentes tanto quando utilizado DNA obtido de cultura de *T. cruzi* e de amostras de pacientes chagásicos, observadas nos ensaios da padronização, foram aqui estabelecidas como bandas diagnóstico. Essa banda de aproximadamente 360 pb pode ocorrer, uma vez que o excesso de DNA pode amplificar fragmentos com

tamanhos maiores que o esperado, pois os *primers* tendem a se anelar distantes um do outro, ou podem produzir um anelamento inadequado com o genoma humano. A banda de menor tamanho produzida é produto de um anelamento inadequado do genoma humano, por isso não é visualizada quando a amostra de DNA obtida de cultura de células, e consideram um controle interno da reação (GOMES et al., 1998). Outros trabalhos também identificaram bandas acima da banda específica, indicando serem produtos de duas ou três seqüências que aparecem repetidas no genoma, em *tandem*, e que esse fenômeno é comum (AVILA et al., 1993; GOMES et al., 1998; VALLEJO et al., 1999; VIRREIRA, et al., 2003; MIYAMOTO et al., 2006).

APLICAÇÃO DA PCR PARA A DETECÇÃO DE DNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM AMOSTRAS DE SANGUE E DE SORO

Foram avaliadas 65 amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos e 35 indivíduos não chagásicos. Um volume de 5 µL de DNA purificado de cada amostra foi utilizado para amplificação com os *primers* TCZ1 e TCZ2.

Após a eletroforese em gel de agarose a 2 %, observamos que, das amostras soropositivas para Chagas, apenas 13 das 65 (20%) apresentaram a banda específica de 188 pb. Além dessas, 14 amostras revelaram o fragmento de 360 pb, o qual representa um outro marcador de DNA de *T. cruzi*. Totalizando assim 27 amostras PCR positivas entre os 65 pacientes chagásicos. Curiosamente, das 35 amostras de indivíduos soronegativos, três foram positivas pela PCR.

Dez microlitros de DNA de cada amostra de soro obtido dos 65 pacientes chagásicos crônicos e dos 35 indivíduos não chagásicos. Dos 65 pacientes soropositivos, 38 (58,5%) apresentaram o seu material amplificado e 27 (41,5%) não revelaram a presença de DNA de *T. cruzi* no soro. Com relação ao grupo controle apenas um, de área endêmica, apresentou a banda de 188 pb. Todas as amostras positivas apresentaram a banda de 188pb ou as duas bandas, 188 pb e a de aproximadamente de 360 pb, no gel de agarose a 2%.

A amostra com maior número de pacientes que apresentaram resultado positivo foi a amostra de soro (38), enquanto que apenas 27 amostras de sangue amplificaram o DNA do *T. cruzi*. As 65 (38+27) amostras com resultados positivos na PCR são provenientes de apenas 51 pacientes, ou seja, 14 pacientes chagásicos apresentaram resultado positivo nas duas amostras analisadas (Tabela 1).

ENSAIOS DE PCR PARA O GENE DA β -GLOBINA HUMANA

Todas as 38 amostras testadas continham DNA íntegro, não existindo nenhum tipo de inibição, uma vez que amplificaram a seqüência de DNA do gene humano da β -globina (Tabela 2). Com relação às amostras de pacientes chagásicos crônicos, das 35 PCR negativas para *T. cruzi*, apenas 24 foram positivas para o gene humano. Após realização de uma nova extração de DNA dessas amostras que apresentaram resultados negativos (n=11) para a β -globina humana, em 8 delas foi possível a detecção de DNA do parasito. Dessa forma, o resultado diagnóstico foi alterado totalizando 38 amostras de soro positivas pela PCR TCZ1 e TCZ2, entre as 65 amostras de pacientes chagásicos crônicos. As amostras negativas sangue e soro foram positivas para a β -globina.

As amostras de soro que após a re-extração de DNA continuaram a gerar resultados negativos para a β -globina humana (3/65; Tabela 2), foram descartadas e excluídas das análises estatísticas, totalizando assim um grupo de 62 amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos incluídos na estatística.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Comparando os resultados dos testes de PCR com TCZ1 e TCZ2 utilizando amostras de soro e sangue de pacientes chagásicos crônicos frente aos resultados da sorologia, das 65 amostras de sangue soropositivas, apenas 27 (41,53%) amplificaram o material genético do *T. cruzi*. Das 35 amostras soronegativas, 3 (8,57%) foram positivas para *T. cruzi*, e foram consideradas falso-positivas. Com relação às amostras de soro dos pacientes chagásicos crônicos, 38 (61,29%) apresentaram a banda de 188 pb e/ou a banda de aproximadamente de 360 pb, e daquelas soronegativas, apenas 1 (1,6%) amostra foi falso-positiva (Tabela 3).

De acordo com Ferreira & Ávila, a especificidade da técnica de PCR utilizando amostras de soro foi de 97,1% (IC= 83,4 ~ 99,9), enquanto a sensibilidade foi 61,3% (IC= 48 ~ 73,1). Quanto às amostras de sangue a sensibilidade foi reduzida a 41,5% (IC= 29,7 ~ 54,4) e a especificidade foi de 91,4% (IC= 75,8 ~ 97,8).

Um dado importante encontrado nos resultados foi relacionado à taxa de positividade quando utilizado o ensaio de PCR com DNA extraído de sangue total e de soro concomitantemente. A sensibilidade alcançada aumentou para 78,5% (IC=

66,2 ~ 87,3) enquanto a especificidade se encontra com 88,6% (72,3 ~ 96,3) (figura 11).

Os dados da especificidade da técnica utilizando a amostra de soro, sangue e as duas amostras concomitantes foram analisados estatisticamente e, foi observado que não houve diferença estatística entre as três formas de uso das amostras (SORO x SANGUE: $p= 0,614$; SORO x Concomitante: $p= 0,356$; SANGUE x Concomitante: $p=1,000$). Com relação à sensibilidade, quando comparado o resultado das amostras de sangue *versus* soro, e sangue *versus* amostras concomitantes houve diferenças estatísticas (SANGUE x SORO: $p = 0,033$; SANGUE x Concomitante: $p= 0.000$), contudo, quando analisado o resultado do soro frente o uso das amostras simultaneamente o valor de p foi maior que 5% (SORO x Concomitante: $p= 0,052$), ou seja, não houve diferença.

Após análise por dois observadores, os resultados foram rodados no programa de estatística para a identificação do índice Kappa, ou teste de concordância. A concordância observada nos resultados da PCR com as amostras de soro foi 0,779 e o valor da taxa observada foi de 91%, e os resultados foram significantes com $p<0,001$.

Com relação aos resultados com as amostras de sangue foi observada concordância regular ($K=0,453$) tendo como taxa observada de 86% ($p<0,001$).

Quando os dados dos observadores frente aos resultados da PCR com amostras de sangue e soro foram comparados, não existiu diferença significativa ($p>0,001$), ou seja, para ambos foi semelhante a visualização ou não das bandas específicas.

Foi realizada uma análise estatística de acordo com a forma clínica dos pacientes e o resultado positivo gerado pela PCR em soro e sangue. Dentre as formas clínicas dos pacientes chagásicos, a que apresentou maior número de resultados positivos na PCR, utilizando DNA purificado de soro e sangue, foi a forma cardíaca, com 63% e 44% respectivamente (Tabela 4).

As amostras que apresentaram resultados positivos foram comparadas entre si de acordo com a forma clínica do paciente. Os resultados da análise estatística mostram que existem diferenças significativas entre a forma cardíaca em relação às demais, quando utilizada a amostra de soro dos pacientes chagásicos crônicos ($p = 0,000$). Entretanto, não houve diferenças entre as demais formas chagásicas (FD, FM, FI) ($p >0,05$). Enquanto que a análise estatística utilizando as amostras de

sangue dos pacientes chagásicos, a forma cardíaca também apresentou diferenças estatísticas (FC x FD: $p = 0,01$; FC x FI: $p = 0,03$; FC x IGN: $p = 0,01$), porém, foi observado que não houve diferenças entre a forma cardíaca e a forma mista (FC x FM: $p = 0,075$) como também não existiu entre as demais formas (FD, FM, FI) ($p > 0,05$).

O grupo etário predominante dos pacientes chagásicos crônicos selecionados ($n=65$) foi a faixa de 20 a 59 anos (55,4%) e o sexo foi o feminino com 60% do total. Quando associada à idade e formas clínicas, não houve diferença significativa ($p=0,2947$), como também não existiu entre a associação do sexo dos pacientes e formas clínicas ($p=0,9469$).

DISCUSSÃO

A dosagem de sangue e soro dos indivíduos estudados foi bastante diferente. As amostras de sangue apresentaram aproximadamente 2x mais DNA (Média=44,75 ng/ μ L) em relação as amostras de soro (Média=27,08 ng/ μ L). Tal diferença nas dosagens influenciou na escolha do volume de DNA utilizado na reação. Ou seja, para amostra de sangue foram utilizados 5 μ L de DNA e, 10 μ L para soro (MOUTINHO et al., 2009). No estudo de Vierreira et al., (2003) foram utilizadas quantidades de 10 a 15 ng de DNA, porém, extraído de sangue de pacientes agudos. Amostras coletadas em áreas endêmicas acarretam no aumento da sensibilidade principalmente se a prevalência de fase aguda for alta (JUNQUEIRA et al., 1996) e, altas quantidades de DNA na reação podem ocasionar inibição da amplificação e/ou anelamentos inespecíficos (GOMES et al., 1998; MELO, 2006).

Os resultados da técnica de PCR utilizando amostras de sangue dos indivíduos envolvidos no estudo, segundo a ciclagem padronizada, mostraram que das 65 amostras de pacientes chagásicos crônicos apenas 27 apresentaram a banda específica de 188 pb e/ ou a banda de aproximadamente de 360 pb, das 35 amostras de indivíduos não chagásicos, 3 indivíduos apresentaram resultados falsos positivos. Em contra partida, das 65 amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos, em 38 foi visualizada a banda específica de 188 pb e/ou a banda de aproximadamente de 360 pb, enquanto que das 35 amostras de soro de indivíduos não chagásicos, apenas 1 apresentou resultado falso positivo.

As amostras de sangue ($n=38$) e de soro ($n=27$) de pacientes chagásicos crônicos que não apresentaram resultados positivos no teste molecular, como

também as amostras de indivíduos não chagásicos (n=35), foram submetidas a PCR utilizando os *primers* PC03 e PC04 para avaliar se realmente houve a obtenção do material genético no momento da extração (SAIKI et al., 1985).

Foi verificada uma maior sensibilidade, 61,3% (IC= 48 ~ 73,1) quando utilizado amostras de soro. Já a sensibilidade alcançada com amostras de sangue foi de 41,5% (IC= 29,7 ~ 54,4). Os resultados, com relação à sensibilidade da PCR no sangue, discordam do percentual obtido em trabalhos de outros pesquisadores (ÁVILA et al., 1993; BRITTO et al., 1995; COURA et al., 1996; JUNQUEIRA et al., 1996; GOMES et al., 1998; WINCKER et al., 1994 (a) e 1994 (b); FERNANDES et al., 2002; CASTRO et al., 2002) que observaram sensibilidade entre 44,6 a 100% quando amostras de sangue humano foram utilizadas. Esta variação pode ser tanto devido às diferenças genéticas que o parasito apresenta (MIYAMOTO et al., 2006) quanto ao protocolo utilizado (GOMES et al., 1998). Porém, a sensibilidade de 61,3% encontrada na PCR em amostras de soro é semelhante à média do parâmetro encontrado por estes autores. Isto demonstra que o soro pode ser utilizado como amostra biológica para PCR utilizando os *primers* TCZ1 e TCZ2 na detecção de infecção chagásica crônica. Além disso, a sensibilidade da PCR pode se elevar quando mais de uma coleta de sangue for realizada, minimizando o número de resultados falsos negativos (JUNQUEIRA et al., 1996; CASTRO et al., 2002; DUFFY et al., 2009). Junqueira et al., (1996) sugerem coletar maiores volumes de sangue para que o sucesso da PCR seja alcançado e Duffy et al., (2009) indicam que a coleta de mais de uma amostra aumenta a sensibilidade da técnica.

Foi possível observar que a especificidade da PCR realizada com as amostras de sangue e de soro foi similar apresentando 91,4% (IC= 75,8 ~ 97,8) e 97,1% (IC= 83,4 ~ 99,9), respectivamente.

Dos indivíduos não chagásicos analisados nessa pesquisa 4 apresentaram PCR positiva (3 PCR de sangue e 1 PCR de soro), sendo considerados resultados falsos positivos. Ávila et al., (1993) e Gomes et al., (1999) obtiveram resultados em que a PCR foi positiva e a sorologia negativa. Castro et al., (2002) demonstraram também resultados falsos positivos, e atribuem a este fato a possibilidade da especificidade dos *primers* utilizados. Além disso, tem sido sugerido que amostras com resultados divergentes deveriam ser testadas com outros *primers* específicos tanto para *T. cruzi* quanto para *T. rangeli* (VALLEJO et al., 1999). Isto pode indicar que esses indivíduos com PCR falsos positivos possam estar infectados com outras

espécies de tripanossomas, uma vez que a prevalência de infecção pelo *T. rangeli* tem sido mostrada em regiões endêmicas da doença de Chagas (RAMIREZ et al., 1997). Outra explicação para esses resultados é de que estes 4 indivíduos apresentam residência em áreas endêmicas para a doença de Chagas. Esses indivíduos poderiam ainda não apresentar anticorpos circulantes anti-*T. cruzi* (CASTRO et al., 2002; BRENIERE et al., 1984) e por isso não foram diagnosticados na sorologia. Alguns pesquisadores consideram que testes sorológicos não possam detectar a infecção de alguns indivíduos chagásicos, ou por conterem baixo título de imunoglobulinas ou por apresentarem distúrbios humorais (LUQUETTI, 1987; BRENIERE et al., 1984; BRENIERE et al., 1989; GOMES et al., 1999).

Nos resultados obtidos neste trabalho todos os pacientes chagásicos apresentaram resultados positivos na sorologia (65). Contudo apenas 51 (65) apresentaram resultados positivos na PCR por apresentarem a banda específica de 188 pb e/ou 360 pb utilizando amostra de soro (38) e sangue (27), ou seja, 14 pacientes apresentaram resultados positivos na PCR quando utilizado DNA obtido de amostras de soro como de sangue. A partir desses dados foi possível calcular a sensibilidade e especificidade da PCR quando utilizadas as amostras de sangue e soro concomitantemente. Enquanto que a especificidade diminuiu para 88,6% (72,3 ~ 96,3), a sensibilidade aumentou para 78,5% (IC= 66,2 ~ 87,3). A sensibilidade aqui calculada corrobora com a literatura, no qual indicam que a utilização de mais de uma amostra coletada aumenta a chances de detecção de DNA (JUNQUEIRA et al., 1996; CASTRO et al., 2002; DUFFY et al., 2009).

De acordo com a figura 11, foi possível avaliar a relação da sensibilidade e especificidade quando as amostras foram analisadas separadamente e concomitantemente. Houve diferenças significativas entre as sensibilidades da técnica quando as amostras de soro e de sangue individualmente foram aplicadas na reação ($p=0,03$), como também existiram diferenças entre a sensibilidade encontrada com as amostras de sangue e as amostras utilizadas simultaneamente ($p = 0,000$). Entretanto quando analisados os resultados com as amostras de sangue e de soro concomitantes verso o resultado da sensibilidade com amostras de soro, não foram observadas diferenças estatísticas ($p = 0,052$). A especificidade da PCR analisada tanto com amostras individualmente ou concomitantemente não apresentou diferenças significativas. Esses resultados indicam que a técnica apresenta sensibilidade alta quando utilizadas amostras de soro ou sangue e soro

simultaneamente, e que a especificidade da técnica é alta quando aplicadas qualquer tipo de amostra.

O fato de amostras de pacientes chagásicos crônicos ter apresentado resultados negativos na PCR, tanto sangue quanto soro, pode ser explicado pela progressão da doença e sua relação com a parasitemia detectável pela PCR, indicando que a sensibilidade da técnica sofre redução dependendo da fase em que se encontra o paciente chagásico (BASQUIERA et al., 2003). Alguns pesquisadores relatam que a área endêmica onde o paciente vive interfere no diagnóstico molecular, devido a diferenças de cepas presentes na região, como também a quantidade de parasitos circulantes na hora da coleta de sangue (JUNQUEIRA et al., 1996; BASQUIERA et al., 2003; PORTELA-LINDOSO, SHIKANAI-YASUDA, 2003; MIYAMOTO et al., 2006) e ao tipo de protocolo utilizado (GOMES et al., 1998).

Esses resultados confirmam que a PCR, utilizando os *primers* TCZ1 e TCZ2, é uma técnica com alta especificidade e que se utilizarmos amostra de soro e sangue simultaneamente, apresentará uma maior sensibilidade em relação à utilização apenas de amostras individualmente, corroborando para os dados da literatura (JUNQUEIRA et al., 1996; CASTRO et al., 2002; DUFFY et al., 2009). Isto permite afirmar que a utilização das duas amostras biológicas para realização da PCR fornece melhores resultados para diagnosticar a doença de Chagas em indivíduos crônicos. A técnica não apresentou diferenças significativas na comparação entre as especificidades entre as amostras. Porém quando utilizamos amostras de soro essa especificidade é alta em relação as demais, 97,1% (IC= 83,4 ~ 99,9).

A análise de dois observadores no que tange os resultados da PCR para amostras de sangue resultou em uma concordância de 45,3%, indicando um percentual “regular” de acordo com a escala de Andrade e Zicher (1997). Em relação à análise das amostras de soro, a concordância resultante foi de 77,9%, considerada “boa” na referida escala.

Quando comparados os dados dos dois observadores frente aos resultados da PCR com a amostra de sangue e de soro não existiu diferenças, ou seja, esta análise indica que a visualização dos resultados da PCR, realizada com os *primers* TCZ1 e TCZ2, foi considerada adequada, podendo ser aplicada em laboratórios de

diagnóstico, onde a análise do gel pode ser feita sem a necessidade de pessoal especializado, sendo considerada uma PCR de fácil leitura.

Foi possível analisar as formas clínicas dos pacientes chagásicos e os resultados da PCR positiva. Dentre as formas crônicas a que apresentou maior positividade foi a forma cardíaca e esta por sua vez foi diferente estatisticamente das demais ($p < 0,05$) quando analisado frente os resultados da PCR com amostras de soro. Entretanto, quando utilizadas as amostras de sangue apenas a forma cardíaca apresentou diferenças entre as formas digestivas, indeterminada, sendo semelhante com a forma mista. Assim, a utilização de amostras de soro para verificar diferenças entre o resultado da PCR frente às formas clínicas apresenta um resultado mais refinado em relação ao uso de amostras de sangue.

A literatura (LUQUETTI et al., 2009) mostram que a forma cardíaca apresenta um número mais elevado de parasitos em relação as outras formas, o que foi evidenciado com o elevado nível de título de anticorpos contra o *T. cruzi* (NAVA, et al., 2001) e valores de citocinas.

CONCLUSÃO

A amplificação do DNA das amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos crônicos e indivíduos não chagásicos através da PCR foi realizada de acordo com a ciclagem térmica de Moser et al., (1989) (35 ciclos), com algumas modificações. O limite de detecção alcançado foi de 10 fg de DNA do *T. cruzi*, ou seja, 0,03 parasito/ensaio ou 0,0002 parasito/extração.

A especificidade alcançada foi semelhante entre os tipos de amostras utilizadas. Por outro lado, a realização da PCR em amostras de soro mostrou uma maior sensibilidade (61,3%) quando comparada a PCR utilizando amostras de sangue (41,5%), sendo semelhante estatisticamente quando utilizadas as amostras concomitantemente (78,5%). Os resultados indicam que a utilização do soro ou das duas amostras concomitantes pode resultar em diagnóstico mais sensível para indivíduos com doença crônica. Desta forma, conclui-se que a técnica de PCR aqui padronizada, por apresentar fácil leitura dos resultados, é um potencial método molecular a ser aplicado em laboratórios de diagnóstico para confirmação de resultados inconclusivos.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Mineo Nakazawa, a Ana Rodrigues pela excelente assistência técnica, a Dra Maria da Glória Cavalcanti pela seleção de alguns pacientes chagásicos que participaram deste estudo. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPEs. Yara M. Gomes é pesquisadora do CNPq, Constança de Britto é pesquisadora do IOC, Fábio Lopes de Melo é pesquisador do CPqAM, Priscilla T. Moutinho é bolsistas do PIBIC/Fiocruz, Myllena de F. A. D. Melo Suellen C. Braz são bolsistas da CAPEs e cursam o mestrado de Saúde Pública do CPqAM/Fiocruz, Izaura M. B. de Lorena é bolsista de Fiotec/Biomangunhos e Virginia M. B. de Lorena é pesquisadora visitante.

REFERÊNCIAS

ÁVILA, H. A. et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polimerase chain raction amplification of Kinetoplast Minicircle DNA: Comparasion with serologic and xenodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.31, n. 9, p. 2421 – 2426, 1993.

ÁVILA, H. A. et al. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 42, p. 175 – 188, 1990.

ÁVILA, H. A. et al. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 211-21, 1991.

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GHUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivos e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.

BASQUIERA, A. L. et al. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and parasitaemia detected by polymerase chain reaction. **Cardiovascular Medicine**, Nova York v. 89, p. 1186-1190, 2003.

BRASIL - Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde-Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.38, supl. 3, 2005.

BRAZ, S. C.; MELO, M. F. A. D.; LORENA, V. M. B.; LORENA, I. M. B.; MOUTINHO, P. T.; VASCONCELOS, R. H. T.; MORAIS, C. N. L.; MELO, F. L.; MELO, A. S. ; SOARES, A. K. A. ; MORAES, A. B. ; SOUZA, W. V. ; GOMES, Y. M. Epidemiological situation of Chagas disease in Pernambuco. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CENTENÁRIO DA DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS, 2009, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: [S/n], 2009. 1 CD ROM.

BRENIERE, S. F. et al. Special humoral depression in chronic patients infected by *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 26, p. 245-258, 1984.

BRENIERE, S. F. et al. Association between *Trypanosoma cruzi* zymodemes and specific humoral depression in chronic chagasic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, Londres, v. 83, p. 517, 1989.

BRITTO, C. et al. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 1, p. 171-2, 1993.

BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; VANNI, C. M. M. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. **Parasitology**, Londres, v. 110, p.241-247, 1995.

BRITTO, C. et al. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 823-826, 2001.

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 102-135, 2009

BRUTUS, L. et al. Congenital Chagas disease: Diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.106, n. 3, p. 195-199, 2008.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico. In: CANÇADO J. R.; CHUSTER M. **Cardiopatia Chagásica**, Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas. 1985.

CANO, M. I. et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for *Trypanosoma cruzi* Genome Project. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 71, p. 273- 278, 1995.

CASTRO, A. M. et al. Blood culture and polymerase chain reaction for diagnosis of chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, Londres, v. 88, p. 894-900, 2002.

CASTRO, C.; CRAIG, S. P.; CASTANEDA, M.; Genomic organization and ploidy number in *T. cruzi*, **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 4, p. 273-282, 1981.

CASTRO, C. et al. Estudo radiológico longitudinal do esôfago, em área endêmica de doença de Chagas, em um período de 13 anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 27, n. 4, p. 227-233, 1994.

CERISOLA, J. A.; ROHWEDDER, R. W.; PRADO, C. E. Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatomíneos. **Boletín Chileno de Parasitología**, Santiago, v.26, p.57-58, 1971.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 11-80, 1909.

CORRAL, R. S. et al. Purification and Characterization of an 80 Kilodalton *Trypanosoma cruzi* Urinary Antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n 1, p. 141-151, 1989.

COURA, J. R. et al. Morbidade da doença de Chagas em áreas do Sertão da Paraíba e da Caatinga do Piauí. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 29, p. 197-205, 1996.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 129, p. 53-59, 2003.

DEGRAVE, W. et al. Peculiar sequence organization of kinetoplast NA minicircle from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 27, p. 63-70, 1988.

DESQUENCE, M.; DÁVILA, A. M.R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 109, p. 213-231, 2002.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2003.

DIAS, J. C.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.41, n.2 p.193-196, 2008.

DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V.; GONZÁLES. An Improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 5, p. 616-23, 1992.

DUFFY, T. et al. Accurate Real- time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 3, n. 4, p. 1-10, 2009.

FERNANDES, J. V. et al. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 40, n.3, p. 141- 146, 2004.

FERNANDES, O. et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exons and ribosomal RNA sequence. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 58, n. 6, p. 807- 811, 1998.

FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BRITTO, C. Molecular Diagnosis of Chagas Disease. In: Simpósio de Biología Molecular y Enfermedad de Chagas, 2002, Rio de Janeiro. **Mesa Redonda**. Disponível:
<http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/lave/md7/md702/fernan.htm> .Acesso em: 24 jul. 2009.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Doença de Chagas. In:_____. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001 cap. 22. p. 241-249.

FERREIRA, L. F. et al. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 75, p. 79-84, 2000.

FREITAS, J. M. et al. Ancestral genomes sex and population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 2, p. 226-235, 2006.

GARRAUD, O. et al. Measures to prevent transfusion-associated protozoal infections in nonendemic countries. **Transfusion Clinique et Biologique**, Paris, v.5, n.2 p.110-112, 2007.

GOMES, M. L. et al. Clinical, laboratory and epidemiological data of chronic chagasic patients residing in the northwestern region of the State of Paraná, Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 22, n.2, p. 587-592, 2000.

GOMES, M. L. et al. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 60, n. 2, p. 205-210, 1999.

GOMES, M. L. et al. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of Polymerase Chain Reaction for detection in human blood. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque v. 88, p. 28-33, 1998.

GOMES, Y. M. PCR and Sero-Diagnosis of Chronic Chagas's Disease. Applied Biochemistry and Biotechnology, **Clifton**, v. 66, n.2, p. 107-19, 1997.

GOMES, Y. M. **Isolement, caracterisation et propriete immunisante d'une proteine (72kDa) ubiquitaire du cycle evolutif de *Trypanosoma cruzi***. 1993. Tese (Doutorado em bioquímica) - Université Pierre et Marie Curie, Paris, 1993.

GOMES, Y. M. Diagnóstico Etiológico. In: MALTA J. (Org). **Doença de Chagas**. São Paulo: Savier, 1996. p. 119-132.

GONTIJO, E. D. et al. Triagem Neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 243-254, 2009.

GONZÁLEZ, A. et al. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.81,p. 3356-3360, 1984.

GRIJALVA , M. J. et al. Blood donors in a vector-free zone of Ecuador potentially infected with *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 360-363, 1995.

GUHL, F. et al. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. **Lancet**, Londres, v. 349, p. 1370, 1997.

GUHL, F. et al. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. **American Journal of Physical Anthropology**, Hoboken, v.108, n. 4, p. 401-407, 1999.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. Interruption of Chagas disease transmission in the Andean Countries: Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 413-415, 1999.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.12, p. 108-114, 1996.

HERRERA, L. et al. Cornea as a tissue reservoir of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, Londres, v.100, p.1395-1399, 2007.

HOTEZ, P. et al. Neglected tropical diseases and HIV/AIDS. **Lancet**, Londres, v. 368, n. 9550, p. 1865-1866, 2006.

HUGGINS, D. W.; MALTA, J.; MEDEIROS, L. B. Quadro Clínico: Fase Aguda. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, cap. IV, p. 39-42, 1996.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 69, n. 10, p. 2904-2909, 1972.

JONES, E. M. et al. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 48, n. 3, p. 348-57, 1993.

JUNQUEIRA, A. C. V.; CHIARI, E.; WINKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in endemic region of north-eastern Brazil. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, Londres, v. 90, p. 129-132, 1996.

JUNQUEIRA, A. C. V.; DEGRAVE, W.; BRANDAO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 270-272, 2005.

KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas' disease) – a tropical disease now in the United States. **The New England Journal of Medicine**, Melbourn, v. 329, p. 639-644, 1993.

KIRCHHOFF, L. V. et al. Comparison of PCR and Microscopic Methods for Detecting *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 5, p.1171-1175, 1996.

KIRCHHOFF, L. V. et al. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. **Transfusion**, Filadelfia, v. 46, n. 2, p.298-304, 2006.

KIRCHHOFF, L. V.; PEARSON, R. D. The emergence of Chagas disease in the United States and Canada. **Current Infection Disease Reports**, Filadelfia, v. 9, n. 5, p. 347-350, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; NAIFF, R. D. Chagas' disease in the Amazon Basin: speculation on transmission *per os*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 22, p. 62-67, 1980.

LUQUETTI, A. O. Megaesôfago e anticorpos anti *Trypanosoma cruzi*. **Revista Goiana de Medicina**, Goiânia, v. 33, p. 1-16, 1987.

LUQUETTI, A. O. et al. Performance levels of four latin American laboratories for the serodiagnosis of Chagas disease in Mexican sera samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 5, p. 797-800, 2009.

LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. (Org). **Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 17. p. 344-378.

MARIN, L. J. et al. Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semiquantitativo utilizando plasmídeo clonado com parte do gene α B de citomegalovírus. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.35, p. 85-94, 2002.

MELO, A. S. et al. Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue no estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.31, n 2, p.69-73, 2009.

MELO, F. L. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em pcr para a detecção de *Schistosoma mansoni***. 2006. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2006

MELO, M. F. A. D. et al. Comparing the effectiveness of three methods for obtaining *Trypanosoma cruzi* DNA from serum of chronic chagasic patients. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CENTENÁRIO DA DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS, 2009, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: [S. n.], 2009. 1 CD ROM.

MESQUITA, R. A. et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n.4, p. 314-319, 2001.

MIYAMOTO, C. T. et al. *Trypanosoma cruzi*: Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in blood of mice infected with different clonal genotypes. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque, v. 112, p. 198-201, 2006.

MOREL, C. et al. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircle. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 77, n. 11, p. 6810-6814, 1980.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 7, p. 1477-1482, 1989.

MOUTINHO, P. T. ; MELO, M. F. A. D. ; BRAZ, S. C. ; LORENA, I. M. B. ; LORENA, V. M. B. ; NAKAZAWA, M. ; MELO, M. G. A. ; MELO, F. L. ; BRITTO, C. F. D. P. C. ; GOMES, Y. M. Avaliação do desempenho de dois métodos de extração de DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos. In: XLV-Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009, Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42. p. 153-153, 2009.

NAVA, A. et al. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagas' disease. **Archivos de Cardiologia de México**, México, v. 71, p. 199-205, 2001.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 107-115, 2003.

RAMIREZ, L. E. et al. Primeira evidencia de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 31, p. 143-148, 1997.

RUSSOMANDO, G. et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polimerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 3, p. 487-491, 1998.

RUSSOMANDO, G. et al. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 11, p. 2864-8, 1992.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of β - globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Possible oral transmission of actue Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 351-357, 1991.

STOBBAERTS, E. Doença de Chagas é a mais esquecida que todas as doenças negligenciadas. **Diário da saúde**, Rio de Janeiro, 22 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=doenca-chagas-mais-esquecida-todas-doencas-negligenciadas&id=4333>>. Acesso em: 07 dez. 2009.

STURM, N. R., et al. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 33, p. 205-214, 1989.

VALENTE, S. A. S. Epidemiologia da transmissão oral da doença de Chagas. Exposição na Mesa Redonda *Situação atual da doença de Chagas na Amazônia*. **XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Florianópolis, 2005.

VALENTE, S. A. S. et al. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas' disease in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94 (1), p.395-398, 1999.

VALLEJO, G. A., et al. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 72, p. 203-212, 1999.

VIRREIRA, M., et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, n.5, p. 574-582, 2003.

WINCKER, P., et al.; Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 51, p. 771-777, 1994(a).

WINCKER, P., et al. High correlation between Chagas disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. **FEMS Microbiology Immunology**, Amsterdam, v. 124, n. 3, p. 419-423, 1994(b).

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet Infectious Diseases**, Boston, v.4, p. 337-348, 2004.

FIGURAS E TABELAS

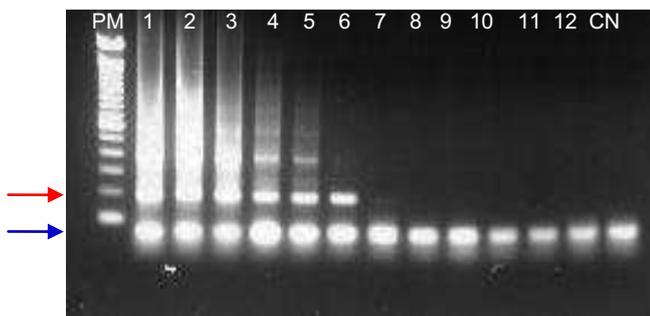


Figura 1. Fragmentos amplificados do gene de *T. cruzi* pela PCR limite de detecção realizada segundo protocolo de Moser. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 - 10ng; 2 - 5 ng; 3 - 1ng; 4 - 0,1ng; 5 - 0,01ng; 6 - 1pg; 7 - 0,1pg; 8 - 0,01pg; 9 - 1,5fg; 10 - 1fg; 11 - 0,5fg; 12 - 0,25fg de DNA de *T. cruzi* em diluições seriadas; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). PM - Peso Molecular – 1000pb; CN - Controle Negativo contém todos os reagentes da PCR sem DNA de *T. cruzi*. Seta em azul= dímeros

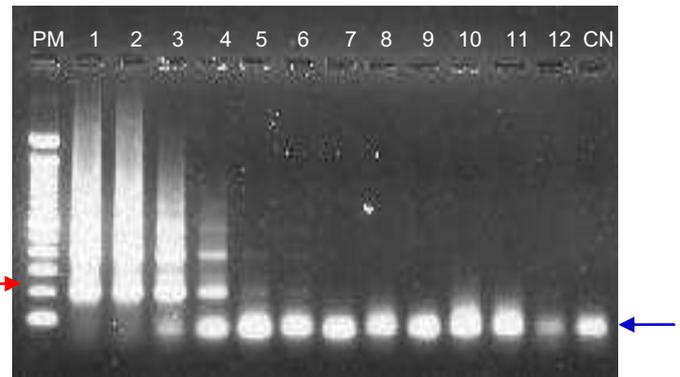


Figura 2. Fragmentos amplificados do gene de *T. cruzi* pela PCR limite de detecção realizada segundo protocolo de Russomando. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 - 10ng; 2 - 5 ng; 3 - 1ng; 4 - 0,1ng; 5 - 0,01ng; 6 - 1pg; 7 - 0,1pg; 8 - 0,01pg; 9 - 1,5fg; 10 - 1fg; 11 - 0,5fg; 12 - 0,25fg de DNA de *T. cruzi* em diluições seriadas; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). PM - Peso Molecular – 1000pb; CN - Controle Negativo contém todos os reagentes da PCR sem DNA de *T. cruzi*. Seta em azul= dímeros de primers

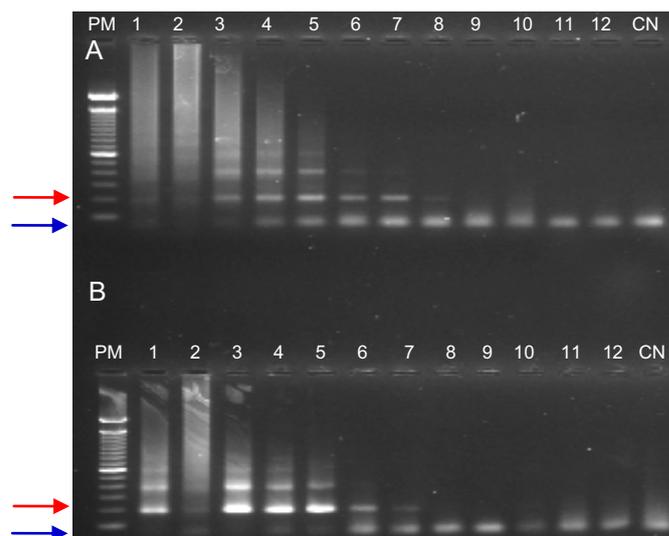


Figura 3. Fragmentos da amplificação do gene de *T. cruzi* pela PCR limite de detecção segundo ciclagem de Moser et al., (1989) utilizando 25 pmol (A) e 50 pmol (B) de cada *primer*. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1-10ng; 2- 5 ng; 3- 1ng; 4- 0,1ng; 5- 0,01ng; 6- 1pg; 7- 0,1pg; 8- 0,01pg; 9- 1,5fg; 10- 1fg; 11- 0,5fg; 12- 0,25fg de DNA de *T. cruzi* em diluição seriada; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). PM- Peso Molecular – 1000 pb; CN - Controle Negativo contém todos os reagentes sem DNA. Seta em azul= dímeros de primers, Seta em vermelho= fragmento de 188 pb

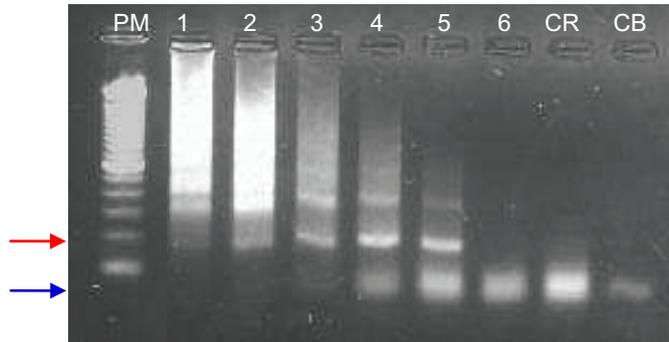


Figura 4. Fragmentos amplificados do gene de *T. cruzi* pela PCR utilizando 35 ciclos. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1- 0,1 ng; 2- 10 pg; 3- 1 pg; 4- 0,1 pg; 5- 0,01 pg; 6- 1,5 fg de DNA de *T. cruzi* em diluição seriada; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). PM – Peso molecular – 1000 pb; CR- Controle da reação contém apenas reagentes da PCR sem DNA de *T. cruzi* e CB- Controle branco, contém todos os reagentes e água. Seta em azul= dímeros de *primers*, seta em vermelho= fragmento de 188 pb.

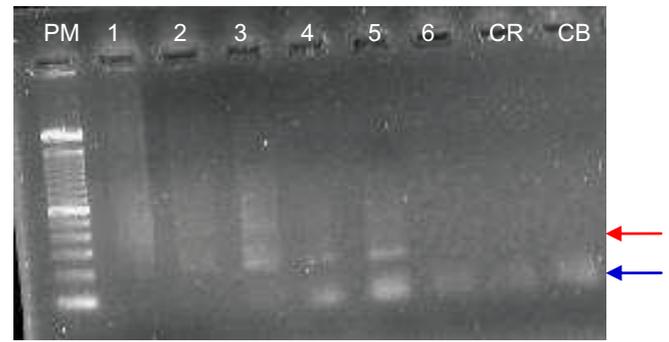


Figura 5. Fragmentos amplificados do gene de *T. cruzi* pela PCR utilizando 40 ciclos. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1- 0,1 ng; 2- 10 pg; 3- 1 pg; 4- 0,1 pg; 5- 0,01 pg; 6- 1,5 fg de DNA de *T. cruzi* em diluição seriada; gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). PM – Peso molecular – 1000 pb; CR- Controle da reação contém apenas reagentes da PCR sem DNA de *T. cruzi* e CB- Controle branco, contém todos os reagentes e água. Seta em azul= dímeros de *primers*, seta em vermelho=

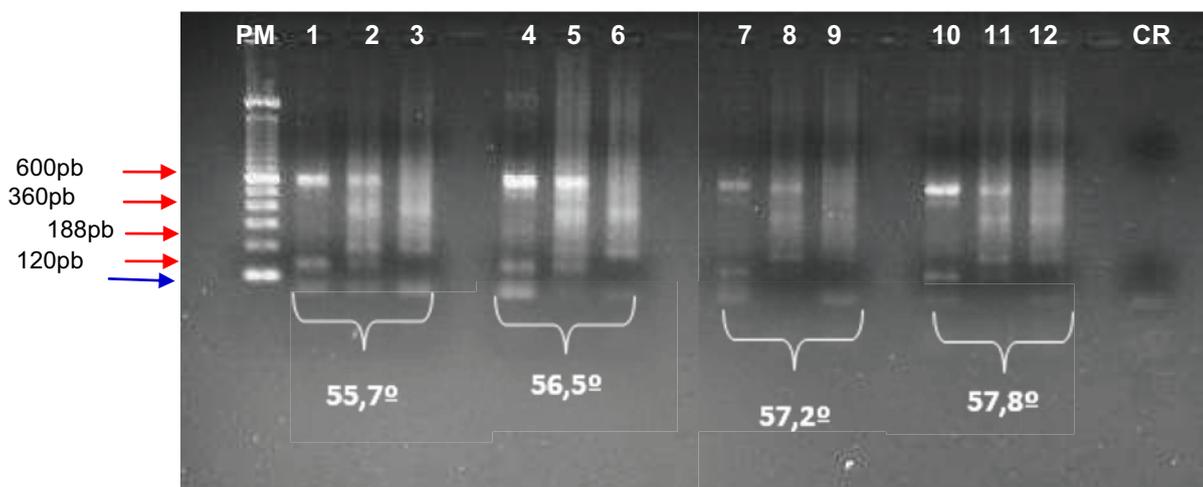


Figura 6. Perfil de fragmentos amplificados pela PCR quando empregado o gradiente de temperaturas de anelamento. Linhas: 1, 2, 3 – temperatura de anelamento 55,7°C; 4, 5, 6 – temperatura de anelamento 56,5°C; 7, 8, 9 – temperatura de anelamento 57,2°C; temperatura de anelamento 57,8°C. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1, 4, 7 e 10 contém DNA de amostras de sangue de indivíduo não chagásico; 2, 5, 8 e 11 contém DNA de amostra sangue de indivíduo não chagásico + DNA de *T. cruzi* (0,1pg); 3, 6, 9 e 12 contém DNA de *T. cruzi* (0,1pg). Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). PM – Peso Molecular – 1000 pb; CR – controle branco, contém todos os reagentes sem DNA. Setas vermelhas indicam o tamanho dos fragmentos visualizados no gel de agarose. Seta azul= dímeros de *primers*. Fragmentos diagnósticos, 188 pb e aproximadamente 360 pb.

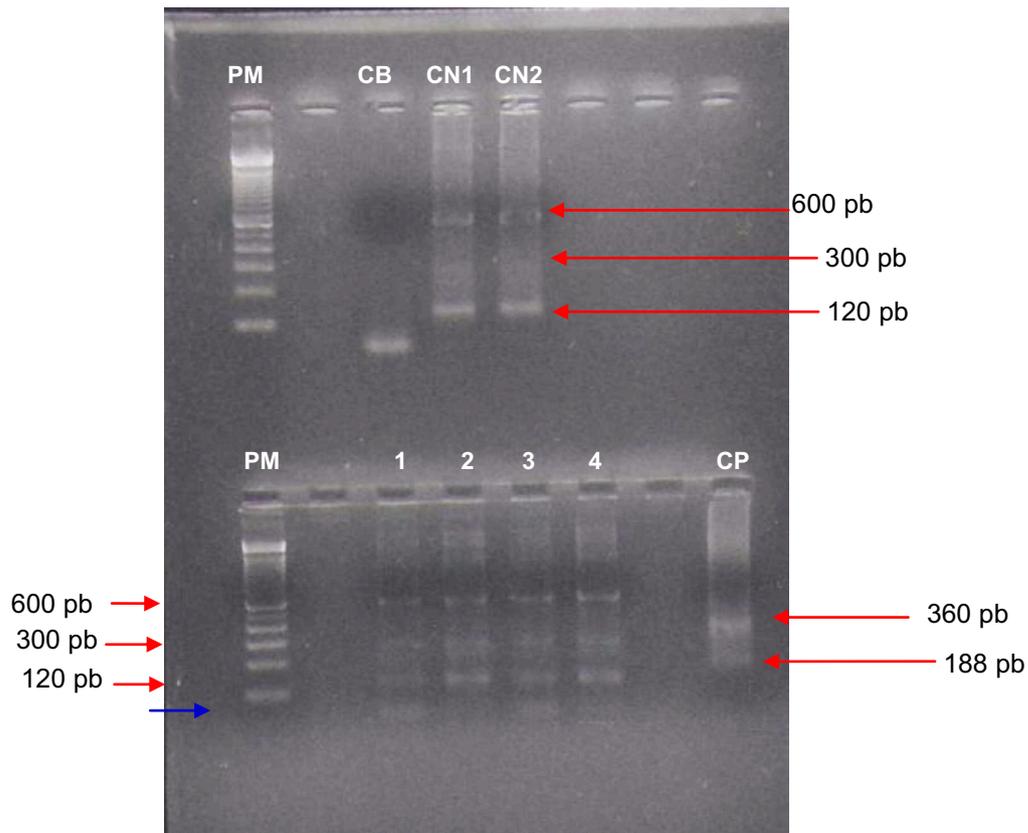


Figura 7. Perfil de fragmentos amplificados pela PCR utilizando menores quantidades de DNA extraído de amostras de sangue de pacientes chagásicos. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 – HUOC 220 (159 ng); 2- HUOC 193 (27 ng); 3- HUOC 220 (79,5 ng); 4 - HUOC 193 (13,5 ng); gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). PM – Peso Molecular – 1000 pb; CN 1 e 2 – Controle negativo contém os reagentes da PCR e amostra de sangue de pacientes chagásicos, CB – Controle branco contém todos reagentes da PCR e mais água sem DNA de *T. cruzi*; CP – Controle Positivo contém todos os reagentes e DNA de *T. cruzi* (0,1pg). Seta em azul= dímeros de *primers*. Seta em vermelho= fragmentos de 188 pb, aproximadamente 120 pb, 300 pb, 360 pb e 600 pb.

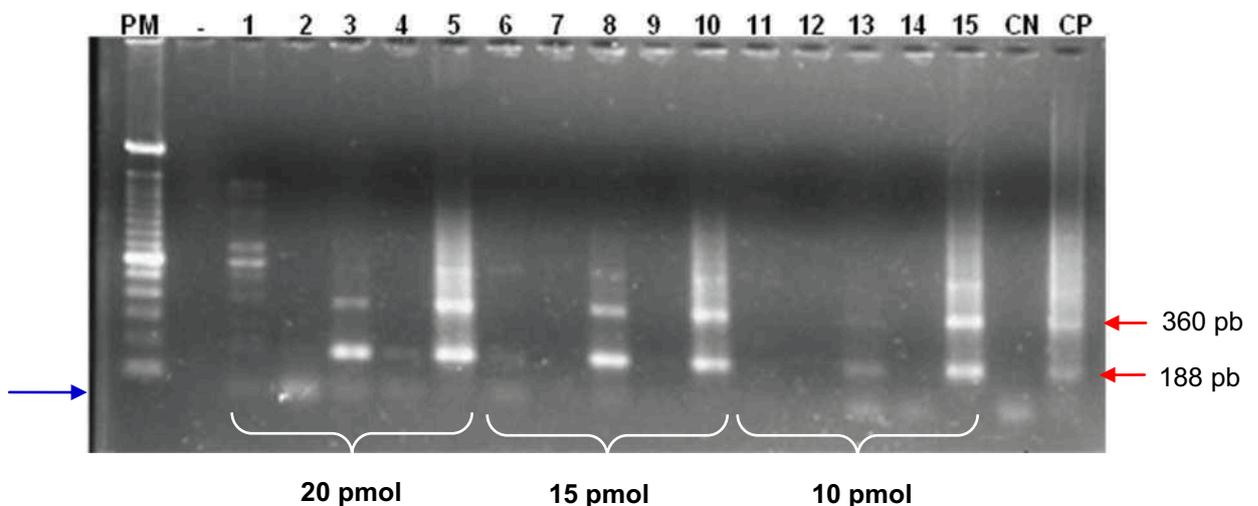


Figura 8. Fragmentos da amplificação de DNA do gene de *T. cruzi* obtido de amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos produzidos pela PCR utilizando diferentes concentrações de *primers*. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1, 2, 3, 4 e 5 – Reação contendo 20 pmol de cada *primer*; 6, 7, 8, 9 e 10 – Reação contendo 15 pmol de cada *primer*; 11, 12, 13, 14 e 15 – Reação contendo 10 pmol de cada *primer*. Linhas: 1, 6, 11 – paciente 193; 2, 7, 12 – paciente 194; 3, 8, 13 – paciente 195; 4, 9, 14 – pacientes 196; 5, 10, 15 – paciente 220. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL).PM- Peso Molecular – 1000 pb; CN – Controle negativo contém os reagentes da PCR e amostra de soro de pacientes chagásicos. CP – Controle Positivo contém todos os reagentes e DNA de *T. cruzi* (0,1pg). Seta em azul= dímeros de *primers*. Seta em vermelho = fragmentos diagnósticos.

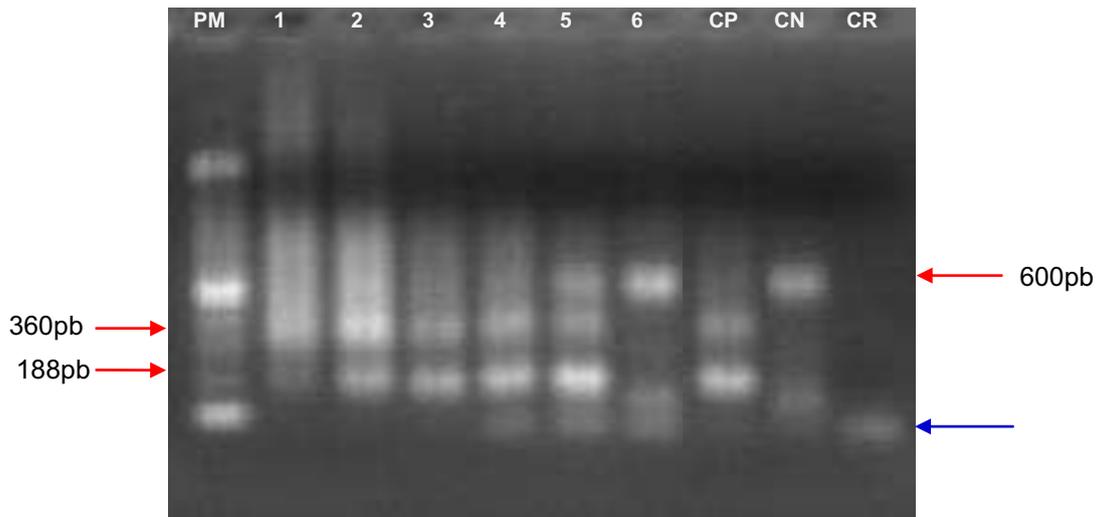


Figura 9. Fragmentos da amplificação do DNA de *T. cruzi* pela PCR utilizando DNA obtido da reconstituição de amostras de sangue de indivíduos não chagásicos contendo concentrações decrescentes de células de *T. cruzi* para o estabelecimento do limite de detecção. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 - 10^3 , 2 - 10^2 , 3 - 10, 4 - 1, 5 - 10^{-1} , 6 - 0 parasitos, diluídas em amostra de sangue de indivíduo não chagásico (soronegativo); gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL).PM- Peso Molecular - 1000 pb; CP- controle positivo, amostra de DNA de tripomastigota de *T. cruzi*; CN- controle negativo, amostra de DNA de sangue de indivíduo não chagásico; CR- controle da reação, apenas reagentes da PCR. Seta em azul= dímeros de *primers*. Seta em vermelho= fragmentos de 188 pb, de aproximadamente 360 pb e 600 pb.

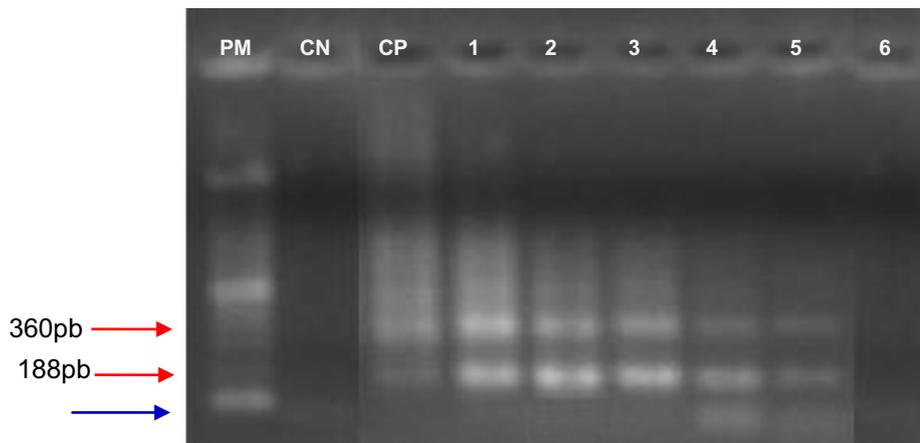


Figura 10. Fragmentos da amplificação do DNA de *T. cruzi* pela PCR utilizando DNA obtido da reconstituição de amostras de soro de indivíduos não chagásicos contendo concentrações decrescentes de células de *T. cruzi* para o estabelecimento do limite de detecção. Fonte: Elaboração própria. Nota: Linhas: 1 - 10^3 , 2 - 10^2 , 3 - 10, 4 - 1, 5 - 10^{-1} , 6 - 0 parasitos, diluídas em amostra de soro de indivíduo não chagásico (soronegativo); gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL).PM- Peso Molecular - 1000 pb; CP- controle positivo, amostra de DNA de tripomastigota de *T. cruzi*; CN- controle negativo, amostra de DNA de sangue de indivíduo não chagásico; CR- controle da reação, apenas reagentes da PCR. Seta em azul= dímeros de *primers*. Seta em vermelho= fragmentos de 188 pb, de aproximadamente 360 pb e 600 pb.

Tabela 1 - Resultados da PCR com os *primers* TCZ1 e TCZ2 frente à amostra utilizada dos pacientes chagásicos.

Amostras de pacientes chagásicos crônicos	Resultados positivos da PCR TCZ1 e TCZ2
Sangue	27/65
Soro	38/65
Total de pacientes com resultado positivo na PCR	51/65

Fonte: Elaboração própria

Tabela 2 - Resultados da PCR β -globina das amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos crônicos frente aos resultados da PCR TCZ1 e TCZ2

Amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos (n=65)	PCR TCZ1 e TCZ2		Amostras soro de pacientes chagásicos crônicos (n=65)	PCR TCZ1 e TCZ2	
	Positivo	Negativo		Positivo	Negativo
PCR β-globina	27	38	PCR β-globina	38	27
Positivo	NR	38	Positivo	NR	24
Negativo	0	0	Negativo	0	3

Fonte: Elaboração própria

Tabela 3 - Comparação dos resultados obtidos pela PCR em amostras de sangue e soro de pacientes chagásicos frente aos resultados da sorologia.

	Amostras de sangue		Amostras de soro	
	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
PCR +	27(41,3%)	3 (8,57%)	38 (61,29%)	1(1,6%)
PCR -	38 (58,7%)	32 (91,43%)	24(38,71%)	34 (98,4%)
Total	65	35	62	35

Fonte: Elaboração própria

Tabela 4 - Associação dos resultados de PCR positivo em soro e sangue e formas clínicas dos pacientes chagásicos crônicos

Formas clínica	Amostras Soro de Pacientes chagásicos PCR+ (n=38)	Porcentagem (%)	Formas clínica	Amostras Sangue de Pacientes chagásicos PCR+ (n=27)	Porcentagem (%)
FD	4	11%	FD	2	7%
FC	24	63%	FC	12	44%
FI	4	11%	FI	5	19%
FM	5	14%	FM	6	22%
IGN	1	3%	IGN	2	7%

Fonte: Elaboração própria

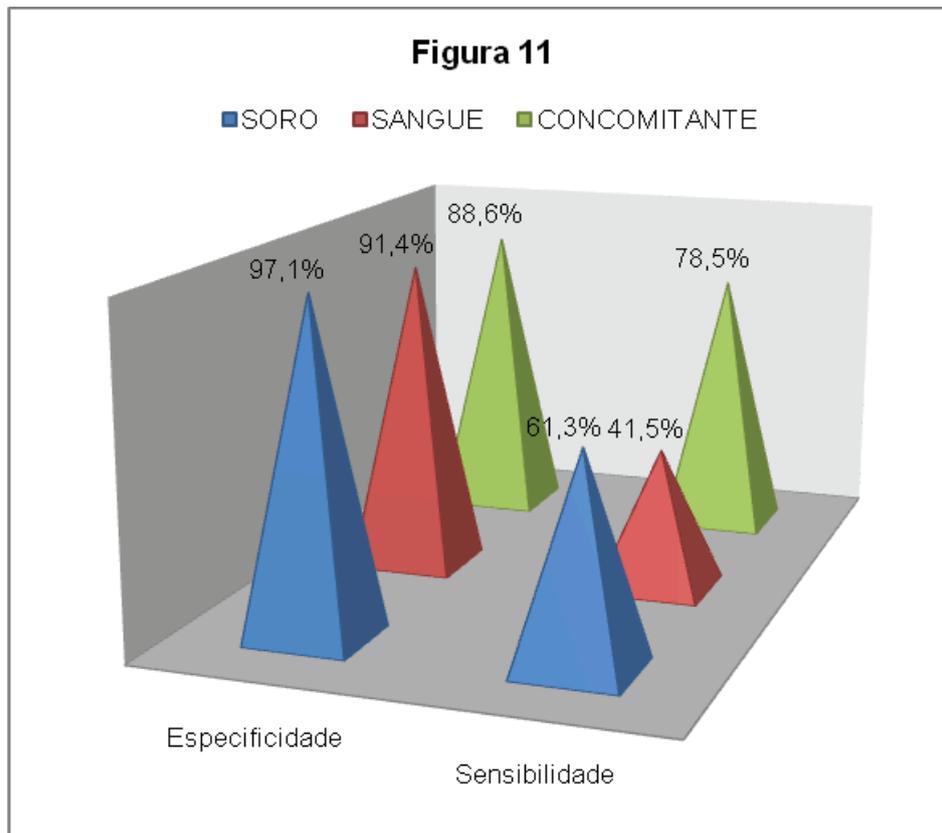


Figura 11. Especificidade e Sensibilidade da PCR utilizando os diferentes tipos de amostras
Fonte: Elaboração própria



Título do Projeto: Avaliação da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Trypanosoma cruzi* em soro e em sangue de pacientes com Doença de Chagas crônica

Pesquisador responsável: Yara de Miranda Gomes

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 20/11/2007

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 96/07

Registro no CAAE: 0096.0.095.000-07

PARECER Nº 007/2008

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 18 de fevereiro de 2011. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 18 de fevereiro de 2008.


Aldemy Fernandes Freyre
Professor
Vice-Coordenador
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 18/02/2009.