LÚCIA MARIA ALMEIDA BRAZ

**Comparação da Reação em Cadeia da
Polimerase com o exame microscópico na
detecção do *Trypanosoma cruzi* em
amostras procedentes do trato digestório do
*Triatoma infestans***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Pediatria
Orientadora: Profa. Dra. Thelma Suely Okay

São Paulo
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Braz, Lúcia Maria Almeida

Comparação da Reação em Cadeia da Polimerase com o exame microscópico na detecção do *Trypanosoma cruzi* em amostras procedentes do trato digestório do *Triatoma infestans* / Lúcia Maria Almeida Braz. -- São Paulo, 2006.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientadora: Thelma Suely Okay.

Descritores: 1.Doença de Chagas/diagnóstico 2.Reação em Cadeia da Polimerase
3.Microscopia 4.Trypanosoma cruzi 5.Conteúdo gastrointestinal 6.Triatoma

USP/FM/SBD-151/06

DEDICATÓRIA

àqueles que são a razão do meu viver:

***minha mãe Isaura, “aquela mulher que faz a escalada da montanha
da vida removendo pedras e plantando flores ” (Cora Coralina)***

meu marido Celso, por todo o amor

meus filhos Celso Daniel e Rafael Alexandre, pela alegria diária

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Thelma Suely Okay pela valiosa orientação, por todo o apoio científico e estímulo.

Ao querido Roberto Raiz Júnior (in memorian) pela co-orientação e amizade. “Obrigada, pela pessoa bonita que você era!”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vicente Amato Neto por ter me introduzido no LIM-36 - ICR, pelo estímulo, apoio e compreensão.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Shikanai-Yassuda por todo o estímulo.

Ao Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira pelo apoio.

Às funcionárias e alunos do LIM-36 pelo apoio e amizade, em especial: à farmacêutica Gilda Maria Bárbara Del Negro pela revisão do texto, à bióloga Lídia Yamamoto pelo auxílio no preparo dos géis, fotos e tabelas, à secretária Maria Luisa Nunes pelas sugestões e à Dra. Sofia Mizuho Miura Sugayama.

À Ruth Semira Alárcon e à Érika Gakiya, biólogas do LIM 46, pelo auxílio nos exames microscópicos e pela amizade.

Aos funcionários do IMT-USP: Almir Robson Ferreira e Maria Iranides Santana de Oliveira por todo o apoio no preparo dos gráficos, tabelas, fotografias e conferência bibliográfica e pela inestimável amizade e encorajamento.

À bióloga Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro do IMT-USP pela doação dos anestésicos e das cepas de *Leishmania*, e pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Ulysses Doria Filho pela análise estatística.

À Profa. Dra. Sônia Regina Testa da Silva Ramos pelas sugestões na aula de qualificação.

Ao Prof. Dr. Silvino Alves de Carvalho pelo incentivo e pelas sugestões ao texto desta tese.

Ao Prof. Dr. José Maria Soares Barata pela doação dos triatomíneos e sugestões na aula de qualificação.

Ao Prof. Dr. Evandro Roberto Baldacci pelas sugestões na aula de qualificação.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior pelo estímulo e à médica-veterinária Luciana Regina Meireles pela doação dos anestésicos.

Ao Prof. Dr. Paulo César Cotrim pela doação das cepas de *Leishmania*.

À Profa. Dra. Marta Teixeira do ICB-USP pela doação da cepa de *T. rangeli*.

À bióloga do INCOR Rosemeire Aparecida Silva por minha apresentação à biologia molecular e pela amizade.

Ao biólogo da FMUSP Marcelo Alves Ferreira, pelas sugestões ao texto na língua inglesa.

À Hertha Bárbara Wullerth Telles de Souza por minha iniciação científica.

Às secretárias do Departamento e do ICR: Denize Terezinha Costa, Solange Ribollo Bastieri Serôdio e Adriana Trindade Bezerra, e à Sra. Mariza Kazue Umetsu Yoshikawa, da biblioteca do ICR.

Aos meus irmãos e irmãs por todo o carinho.

O apoio de todos foi fundamental para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Formas de transmissão da doença de Chagas.....	4
1.2 Fases da doença de Chagas	7
1.3 Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas	9
1.4 Comparação da PCR com o xenodiagnóstico, hemocultura, exame microscópico e técnicas sorológicas, na análise de amostras sanguíneas.....	13
1.5 Comparação da PCR acoplada ao exame microscópico realizado no âmbito do xenodiagnóstico, na análise de amostras procedentes de triatomíneos.....	17
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	19
3. HIPÓTESE DO ESTUDO.....	21
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo geral.....	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
5. ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO.....	26
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
6.1 Procedência dos triatomíneos.....	29
6.2 Procedência da cepa Y do <i>T. cruzi</i>	30
6.3 Procedência dos camundongos Balb/C.....	30

6.4 Protocolo de infecção dos camundongos, com a cepa Y, do <i>T. cruzi</i>	31
6.5 Protocolo de alimentação dos triatomíneos nos camundongos Balb/C, infectados com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> e em controles.....	32
6.6 Definição dos períodos de exame dos triatomíneos por EM e PCR.....	33
6.7 Triatomíneos, EM, PCR e falso-positivo.....	33
6.8 Exame Microscópico (EM) das amostras procedentes do tubo digestório....	34
6.9 Protocolo de extração do DNA do <i>T. cruzi</i> das amostras procedentes do tubo digestório de triatomíneos.....	34
6.10 Medidas preconizadas para a realização da PCR.....	35
6.11 Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores.....	36
6.12 Protocolo da PCR em amostras procedentes do tubo digestório..	37
6.13 Teste de Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ.....	38
6.14 Fase 1 - Modelo de Alta Parasitemia.....	39
6.15 Fase 2 - Modelo de Baixa Parasitemia.....	41
6.16 Análise Estatística.....	43
7. RESULTADOS	44
7.1 Análise de amostras procedentes do tubo digestório.....	45
7.2 Amplificação do fragmento de 144 pares de base.....	45
7.3 Teste de especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ.....	46
7.4 Análise estatística dos resultados obtidos após a triplicata.....	49
7.5 Resultados da 1ª Fase – Modelo de Alta Parasitemia.....	50
7.6 Resultados da 2ª Fase – Modelo de Baixa Parasitemia.....	56
8. DISCUSSÃO	61
8.1 Amostras de material biológico obtido do tubo digestório dos triatomíneos: definição da análise individual versus análise de “pool”	62
8.2 Extração de DNA para a PCR.....	63
8.3 Extração de DNA para a PCR e inibidores da amplificação.....	64
8.4 PCR: comparação do DNA nuclear com o cinetoplástico.....	67
8.5 PCR nas amostras negativas.....	68
8.6 Teste de Especificidade com os oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ do <i>T. cruzi</i>	69
8.7 Triplicata da PCR.....	70
8.8 Comparação do EM com a PCR (DNA cinetoplástico comparado com o DNA nuclear).....	71
8.9 Comparação da PCR com o EM na Alta e na Baixa Parasitemia.....	75
8.10 Concordância da PCR com o EM na Alta e na Baixa Parasitemia – Vantagens e desvantagens da PCR e do EM.....	76
8.11 Avaliação da realização da PCR de acordo com os tempos após o xenodiagnóstico – Importância da precocidade da realização dos exames.....	77
9. CONCLUSÕES	81

10. ANEXOS.....	83
Anexo A Exame direto para o diagnóstico do <i>T. cruzi</i> após concentração por micro-hematócrito e QBC.....	84
Anexo B Diagnóstico do <i>T. cruzi</i> após multiplicação em meio LIT – Hemocultura.....	85
Anexo C Técnicas sorológicas para o diagnóstico da doença de Chagas (Hemaglutinação Indireta, Imunofluorescência Indireta e ELISA).....	86
Anexo D Gene Bank – Resultados do “Blast” para o <i>T. rangeli</i>	88
Anexo E Gene Bank – Resultados do “Blast” para a <i>L. amazonensis</i>	89
Anexo F Gene Bank – Resultados do “Blast” para a <i>L. braziliensis</i>	90
Anexo G Gene Bank – Resultados do “Blast” para a <i>L. chagasi</i>	91
Anexo H Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Alta Parasitemia – Comparação da PCR SIMPLES com a PCR em TRIPLICATA – 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia.....	92
Anexo I Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Baixa Parasitemia – Comparação da PCR SIMPLES com a PCR em TRIPLICATA – 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º 25º, 30º e 60º dia.....	93
Anexo J Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Alta Parasitemia – Comparação do EM com a PCR – TEMPOS PRECOCES	94
Anexo K Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Alta Parasitemia – Comparação do EM com a PCR – TEMPOS INTERMEDIÁRIOS.....	95
Anexo L Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Alta Parasitemia – Comparação do EM com a PCR – TEMPOS TARDIOS.....	96
Anexo M Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Baixa Parasitemia Comparação do EM com a PCR – TEMPOS PRECOCES.....	97
Anexo N Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Baixa Parasitemia – Comparação do EM com a PCR – TEMPOS INTERMEDIÁRIOS.....	98
Anexo O Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Baixa Parasitemia – Comparação do EM com a PCR – TEMPOS TARDIOS.....	99
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – do inglês “Acquired Immunodeficiency Syndrome” ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CO₂ – dióxido de carbono

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – mistura dos quatro desoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)

EDTA – sal tripotássico do ácido etileno-diamino-tetracético

ELISA – do inglês “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

EM – Exame Microscópico

FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

F2/B3 – oligonucleotídeos iniciadores oriundos da seqüência nuclear repetitiva ou TCZ do genoma do *T. cruzi* que amplificam um fragmento de 144 pb

HAI – Hemaglutinação Indireta

HIV – do inglês “Human Immunodeficiency Vírus” ou Vírus da Imunodeficiência Humana

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas da USP

IFI – Imunofluorescência Indireta

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IMT – Instituto de Medicina Tropical da USP

INCOR – Instituto do Coração

KCl – cloreto de potássio

kDNA – DNA cinetoplástico do *T. cruzi*

LIM /36 – Laboratório de Investigação Médica, número 36, do Departamento de Pediatria da FMUSP

LIM/46 - Laboratório de Investigação Médica, número 46, do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP

LIT – do inglês “Liver Infusion Tryptose”

L. amazonensis – abreviatura do nome *Leishmania amazonensis*

L. braziliensis – abreviatura do nome *Leishmania braziliensis*

L. chagasi – abreviatura do nome *Leishmania chagasi*

MgCl₂ – cloreto de magnésio

(NH₄)₂SO₄ – sulfato de amônia

PB – Paraíba

PCR – do inglês “Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase

QBC - do inglês “Quantitative Buffy Coat”

RIPA – Teste sorológico por radioimunoprecipitação

R. prolixus – abreviatura do nome do triatomíneo *Rhodnius prolixus*

RS – Rio Grande do Sul

TAE – solução-tampão composta por Tris, ácido acético glacial e EDTA

Taq DNA polimerase – enzima DNA polimerase produzida pela bactéria *Thermus aquaticus*

T. cruzi – abreviatura do nome do parasita *Trypanosoma cruzi*

TCZ – nome da sequência nuclear repetitiva de 196 pb do genoma do *T. cruzi*

TESA-blot – Teste sorológico por immunoblotting com antígenos de secreção-excreção da forma tripomastigota

T. rangeli – abreviatura do nome do parasita *Trypanosoma rangeli*

Tris-HCl – sal Trizma com pH corrigido por adição de ácido clorídrico

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

> - maior que

< - menor que

mg – microgramas

mL – microlitro

mM – micromolar

mg/Kg – miligrama por quilo

mm³ – milímetro cúbico

mM – milimolar

ng - nanogramas

nm – nanômetro

pb – do inglês “base pair” ou pares de base

% - porcentagem

pH – potencial hidrogeniônico

r.p.m. – rotações por minuto

UV – ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ultra-estrutura da forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	3
Figura 2 – Representação esquemática das etapas realizadas no projeto de pesquisa. Fase 1	40
Figura 3 - Representação esquemática das etapas realizadas no projeto de pesquisa. Fase 2	42
Figura 4 – Detecção de DNA do <i>T. cruzi</i> por PCR em amostras procedentes do trato digestório dos triatomíneos.....	46
Figura 5 – Teste de especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ realizado com amostras de DNA de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i>	48
Figura 6 - Teste de especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ realizado com amostras de DNA de <i>T. rangeli</i> <i>sangustini</i>	49
Figura 7 – Comparação da PCR com o EM em amostras procedentes do trato digestório de triatomíneos no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia após o repasto sanguíneo em camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e com alta parasitemia.....	54
Figura 8 - Comparação da PCR com o EM em amostras procedentes do trato digestório de triatomíneos no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia após o repasto sanguíneo em camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e com baixa parasitemia.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teste de especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ com o DNA de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. chagasi</i> e <i>T. rangeli</i> em diferentes concentrações.....	47
Tabela 2 – Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em amostras procedentes do trato digestório do <i>T. infestans</i> . Os insetos foram infectados em camundongos com alta parasitemia, e o material do trato digestório dos mesmos foi analisado 1, 2, 3, 4 e 5 dias após o repasto sanguíneo.....	53
Tabela 3 – Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em amostras procedentes do trato digestório do <i>T. infestans</i> . Os insetos foram infectados em camundongos com alta parasitemia, e o material do trato digestório dos mesmos foi analisado 10, 15, 20 e 25 dias após o repasto sanguíneo.....	53
Tabela 4 – Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em amostras procedentes do trato digestório do <i>T. infestans</i> . Os insetos foram infectados em camundongos com alta parasitemia, e o material do trato digestório dos mesmos foi analisado 30 e 60 dias após o repasto sanguíneo.....	54
Tabela 5 - Comparação da detecção da cepa Y de <i>T. cruzi</i> pela PCR e pelo EM em amostras procedentes do trato digestório de 106 triatomíneos infectados em camundongos com alta parasitemia.....	55
Tabela 6 – Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em amostras procedentes do trato digestório do <i>T. infestans</i> . Os insetos foram infectados em camundongos com baixa parasitemia, e o material do trato digestório dos mesmos foi analisado 1, 2, 3, 4 e 5 dias após o repasto sanguíneo.....	58

Tabela 7 – Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em amostras procedentes do trato digestório do <i>T. infestans</i> . Os insetos foram infectados em camundongos com alta parasitemia, e o material do trato digestório dos mesmos foi analisado 10, 15, 20 e 25 dias após o repasto sanguíneo.....	58
Tabela 8 – Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em amostras procedentes do trato digestório do <i>T. infestans</i> . Os insetos foram infectados em camundongos com alta parasitemia, e o material do trato digestório dos mesmos foi analisado 30 e 60 dias após o repasto sanguíneo.....	59
Tabela 9 - Comparação da detecção da cepa Y de <i>T. cruzi</i> pela PCR e pelo EM em amostras procedentes do trato digestório de 216 triatomíneos infectados em camundongos com baixa parasitemia.....	60

RESUMO

Braz LMA. Comparação da Reação em Cadeia da Polimerase com o exame microscópico na detecção do *Trypanosoma cruzi* em amostras procedentes do trato digestório do *Triatoma infestans*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 113p.

Pacientes imunossuprimidos podem apresentar episódios de reativação da doença de Chagas com exames parasitológicos diretos negativos, sendo recomendado o xenodiagnóstico, muito embora esta técnica dependa da experiência do biólogo e requeira de 30 a 60 dias. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido utilizada na tentativa de melhorar a sensibilidade do xenodiagnóstico. O presente estudo teve como objetivo comparar a PCR com o exame microscópico (EM) realizado no âmbito do xenodiagnóstico, na detecção do *T. cruzi* em amostras do trato digestório do *T. infestans*, em diferentes períodos após contaminação dos insetos em camundongos Balb/C infectados experimentalmente, divididos em grupo de alta e de baixa parasitemia. No primeiro grupo, 110 triatomíneos foram divididos em 11 grupos de 10 insetos cada, e no segundo grupo, 220 triatomíneos foram divididos em 11 grupos de 20 triatomíneos cada. Nos dois grupos foram analisados insetos não infectados. Amostras obtidas no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia após

repasto sangüíneo foram separadas em duas alíquotas: uma destinada ao EM e a outra à PCR. A amplificação foi realizada com um novo par de oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ de *T. cruzi*. Pelas duas técnicas, todas as amostras de insetos não infectados foram negativas. No modelo de alta parasitemia, no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia, os resultados foram: 75%, 60%, 50%, 40%, 60%, 90%, 100%, 88,9%, 88,9%, 100% e 90% de positividade pela PCR; e 50%, 30%, 30%, 40%, 30%, 60%, 50%, 55,6%, 33,3%, 70% e 20% pelo EM. No modelo de baixa parasitemia, no 1º dia, apenas a PCR foi positiva em 40% dos casos, sendo que no 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia, a PCR apresentou positividade de 55%, 40%, 70%, 63%, 60%, 65%, 52,6%, 60%, 78,9% e 68,4%; e pelo EM 5%, 5%, 15%, 15,8%, 25%, 25%, 31,6%, 30%, 36,8% e 36,8%, respectivamente. O teste de McNemar comparou os resultados da PCR com os do EM e demonstrou que houve discordância, e que essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), indicando superioridade da PCR em relação ao EM do xenodiagnóstico. Os resultados do presente estudo permitiram concluir que a PCR apresentou vantagens em termos diagnósticos para a doença de Chagas quando comparada ao EM, como exame complementar ao xenodiagnóstico, em 10 dos 11 tempos estudados no grupo de alta parasitemia, e em todos os tempos na baixa parasitemia. O modelo de baixa parasitemia tentou simular a parasitemia na reativação da doença de Chagas nos pacientes imunossuprimidos, e o diagnóstico da reativação nos tempos precoces é de relevância clínica, uma vez que poderá influenciar o prognóstico dos pacientes.

Descritores: Doença de Chagas/diagnóstico, Reação em Cadeia da Polimerase, Microscopia, *Trypanosoma cruzi*, Conteúdo gastrointestinal, *Triatoma*

SUMMARY

Braz LMA. Comparison of Polymerase Chain Reaction with microscopic examination to detect *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* digestive tract samples. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2006. 113p.

Immunosuppressed patients may experience episodes of Chagas disease reactivation with negative direct parasitological investigation. In this situation xenodiagnosis is recommended, even though this technique depends very much on the biologist's background to detect *T. cruzi* under microscopic examination and demands 30 to 60 days. Polymerase Chain Reaction (PCR) has been used to increase sensitivity of xenodiagnosis. The present study has aimed at comparing detection of *T.cruzi* in *T.infestans* digestive tract samples by PCR and microscopic examination (ME) performed in the context of xenodiagnosis, at different times after bugs feeding in Balb/C mice experimentally infected by *T.cruzi*, and divided in two groups: with high parasitemia and with low parasitemia. Representing the first group, 110 triatomines were divided in 11 groups of 10 triatomines each, and fed in Balb/C mice presenting with high parasitemia of *T.cruzi*. As controls, 110 triatomines were divided in 11 groups of 10 insects each, and were fed in non infected mice. The second group was composed of 220 triatomines divided in 11 groups of 20 triatomines each, and

fed in mice presenting low parasitemia of *T.cruzi*. As controls, 55 triatomines were divided in 11 groups of 5 insects each, and were fed in non infected mice. Samples of all triatomines of each group were examined on the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th, 30th and 60th day after feeding. Samples were separated in two aliquots: the first one was examined by ME and the second one by PCR. Amplifications were performed with a new pair of primers from the genomic TCZ sequence of *T.cruzi*. Results showed that all samples from control triatomines were negative by both methods. On the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th, 30th and 60th day, of the high parasitemia model, results were: 75%, 60%, 50%, 40%, 60%, 90%, 100%, 88.9%, 88.9%, 100% and 90% of positivity by PCR; and 50%, 30%, 30%, 40%, 30%, 60%, 50%, 55.6%, 33.3%, 70% and 20% by ME, respectively. In the low parasitemia model, on the 1st day, only PCR was positive in 40% of cases and on the 2nd, 3rd, 4th, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th, 30th and 60th day, PCR presented positivity of 55%, 40%, 70%, 63%, 60%, 65%, 52.6%, 60%, 78.9% and 68.4%; and by ME 5%, 5%, 15%, 15.8%, 25%, 25%, 31.6%, 30%, 36.8% and 36.8%, respectively. The statistical analysis made by means of the McNemar procedure showed discordances among results obtained by PCR and ME. This difference was statistically significant ($p < 0.05$), thus indicating superiority of PCR with respect to ME. We concluded that the PCR technique presented with advantages to Chagas disease diagnosis when compared to ME, as a complementary test of xenodiagnosis, in 10 of 11 times in the high parasitemia model, and in all study times in the low parasitemia model. Considering that the low parasitemia model resembles the situation found in

immunosuppressed patients with reactivation of Chagas disease, this finding is of clinical relevance as it may influence medical decisions and the prognosis of those patients.

Descriptors: Chagas disease/diagnostic, Polymerase Chain Reaction, Microscopy, *Trypanosoma cruzi*, Gastrointestinal contents, *Triatoma*

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana, descrita por Carlos Chagas em Lassance, Minas Gerais, em 1909, afeta 16 a 18 milhões de pessoas na América Latina, onde mais de 100 milhões estão expostos ao risco de infecção (Coura, 2003).

O *Trypanosoma cruzi* (Figura 1), agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado. Seu ciclo evolutivo inclui a passagem obrigatória por hospedeiros mamíferos, incluindo o homem, além de insetos hemípteros, hematófagos, comumente chamados barbeiros, dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*, pertencentes à família *Reduviidae* (Coura, 2003). Os triatomíneos são classificados do seguinte modo: Reino Animalia, Filo Arthropoda, Subfilo Mandibulata, Classe Insecta, Subclasse Pterigota, Ordem Hemiptera, Subordem Gymnocerata, Superfamília Reduvioidea, Família Reduviidae, Subfamília Triatominae (Santos-Mallet, 2000).

O *Triatoma infestans* é a principal espécie vetora do *T. cruzi* em grande parte da América do Sul, estendendo sua distribuição do sul da Argentina à região nordeste do Brasil. É extremamente domiciliada, vivendo no microclima

das habitações humanas. No Brasil, da mesma forma que nos outros países da América do Sul em que ocorre, mantém seus hábitos antropofílicos bastante acentuados (Sherlock, 2000). Nos barbeiros, o *T. cruzi* multiplica-se no tubo digestório, sendo as formas infectantes eliminadas com suas fezes e urina. Nos vertebrados, circula no sangue e sofre multiplicação nos tecidos (Coura, 2003).

Figura 1 – Ultra-estrutura da forma tripomastigota de *T. cruzi* (Fonte: Rey, 1991). **K**, cinetoplasto; **B**, blefaroplasto; **V**, vacúolo; **RE**, retículo endoplasmático; **M**, mitocôndria; **F**, flagelo; **L**, lisossomos; **N**, núcleo; **mt**, microtúbulos; **G**, aparelho de Golgi; **R**, ribossomos

A doença, inicialmente uma zoonose, passou a se constituir em problema de patologia humana, ou seja, uma antropozoonose, a partir da domiciliação dos vetores, deslocados de seus ecótopos silvestres originais pela ação do homem sobre o ambiente (Silveira e Vinhaes, 1998).

A modificação ambiental antrópica, principalmente a substituição da floresta natural por terra cultivada, pode produzir concentração de mamíferos

selvagens e triatomíneos no peridomicílio, gerando ciclos de transmissão local do *T. cruzi* (Bar et al., 2002).

1.1 Formas de transmissão da doença de Chagas

A transmissão natural se faz pela contaminação da pele ou mucosas pelas fezes dos vetores, conhecidos genericamente por triatomíneos e popularmente por barbeiros, com formas infectantes de *T. cruzi*. Os mecanismos secundários de transmissão ocorrem por via sangüínea ou transfusional, transplacentária, congênita, aleitamento materno, via oral, transplante de órgãos e contaminação acidental em laboratório. Entre essas outras possibilidades de veiculação da doença, tem especial importância epidemiológica a transmissão por transfusão de sangue, que pode levá-la para áreas nas quais não há transmissão natural, inclusive grandes centros urbanos. Além disso, a transmissão congênita pode representar risco mais duradouro de produção de novos casos e conseqüente manutenção da endemia chagásica (Silveira e Vinhaes, 1998).

A doença de Chagas adquirida por transfusão é a segunda modalidade de infecção pelo *T. cruzi* em freqüência. Sendo assim, dez países na América do Sul, e três na América Central testam 100% dos doadores de bancos de sangue. Outros países apresentam cobertura mais baixa. A taxa de infecção entre os receptores de sangue varia de 1,4 a 18% na Argentina, Brasil e Chile,

podendo chegar a 48% na Bolívia (Lazdins-Helds, 2001). Segundo estudo de Wendel (2005), que avaliou 147 serviços com atividade hemoterápica no Brasil, a prevalência estimada de doadores infectados por *T. cruzi* varia de 0,1% a 0,2% mediante provas consideradas como padrão de referência arbitrário (TESA-Blot, IFI, RIPA e quimioluminescência com tripomastigotas). As dificuldades econômicas na América Latina estimulam a migração para áreas urbanas, provocando êxodo rural que afeta cerca de 75% da população destas áreas, aumentando a possibilidade de transmissão da infecção pelo *T. cruzi* por intermédio de transfusão sangüínea nas cidades. O problema tem se estendido para os países desenvolvidos devido aos movimentos migratórios. O risco de infectividade definido como a probabilidade do indivíduo se tornar infectado quando recebe uma unidade de hemocomponente infectada tem sido estimada em 20% para o *T. cruzi* (Lazdins-Helds, 2001).

A doença de Chagas congênita vem crescendo em importância nas últimas décadas em regiões endêmicas e urbanas, onde se concentra grande número de imigrantes com a doença de Chagas. Estudos anatomopatológicos realizados nas décadas de 60 e 70 em fetos, natimortos e prematuros, evidenciaram as graves repercussões da infecção intra-uterina. A partir da década de 80, estudos prospectivos mostraram por meio dos diferentes métodos diagnósticos - parasitológico, sorológico e anatomopatológico - formas clínicas variadas desta modalidade da doença de Chagas. Tais formas podem apresentar-se de diversas maneiras no conceito, variando desde infecção assintomática, ou sintomática (crescimento intra-uterino restrito, prematuridade,

febre, hepatoesplenomegalia, meningoencefalite), podendo levar ao óbito fetal. Os fatores de risco para a transmissão materno-fetal do *T. cruzi* não estão bem esclarecidos, podendo a cepa do *T. cruzi* e a presença de parasitas circulantes constituir elementos significativos. O diagnóstico da infecção congênita é confirmado pela presença do parasita no sangue do recém-nascido. Os anticorpos IgM podem ser detectados por métodos mais sensíveis e específicos como o “western blot” (Umezawa et al., 1996). A persistência de IgG por período superior a seis meses é indicativa de infecção congênita (Nisida, 1998). O tratamento precoce leva à cura na maioria dos casos (Chieffi e Amato Neto, 2000).

O aleitamento materno tem sido considerado um dos possíveis meios de transmissão da moléstia, e a literatura médica que versa sobre o tema, embora escassa, tem evidenciado a importância desta via (Chieffi e Amato Neto, 2000).

Na região Amazônica tem sido registrado aumento do número de casos autóctones, os quais são quase sempre atribuídos aos outros meios de transmissão, como a oral e a extra-domiciliar. Esta última está relacionada às atividades de trabalho, especialmente a extração da piaçaba, principal habitat do *Rhodnius brethesi* (Silveira, 2003).

O primeiro surto de infecção humana pelo *T. cruzi* que ocorreu devido à transmissão oral do parasita foi relatado em 1968, quando 17 alunos de uma escola agrícola do município de Estrela (RS), apresentaram quadro agudo da doença de Chagas, sendo que seis indivíduos morreram. Outro surto semelhante ocorreu, no final da década de 80, na cidade de Catolé do Rocha

(PB), atingindo 26 pessoas, das quais uma faleceu. Em março de 2005, novo surto de doença de Chagas aguda ocorreu na região litorânea de Santa Catarina, atingindo 25 pessoas e resultando em três mortes (Steindel et al., 2005).

1.2 Fases da doença de Chagas

A infecção chagásica apresenta duas fases bem distintas: a fase aguda ou inicial, assintomática ou oligossintomática na maioria dos casos, ou sintomática com febre, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, conjuntivite unilateral (sinal de Romana), miocardite e meningoencefalite. Ela pode ser fatal em até 10% dos casos, principalmente naqueles com meningoencefalite e, quase sempre fatal em crianças com menos de dois anos de idade, segundo observações do próprio Carlos Chagas e pesquisadores contemporâneos (Coura, 2003). Essa fase caracteriza-se pela presença do *T. cruzi* no exame direto do sangue.

Aproximadamente dois meses após o início da fase aguda, o *T. cruzi* desaparece da corrente sangüínea, podendo ser detectado somente pelo xenodiagnóstico, hemocultura ou a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Após período de latência de 10 a 15 anos, durante o qual considera-se que o paciente esteja na fase indeterminada da doença, esta costuma evoluir de três formas:

- a) cardíaca, com miocardite crônica, insuficiência cardíaca e eventualmente morte súbita, por arritmia cardíaca
- b) digestiva, com megaesôfago e megacólon
- c) mista com cardiopatias e “megas” simultaneamente. Cerca de 50% dos casos, dependendo da área endêmica, permanecem na forma indeterminada, sem manifestações cardíacas ou digestivas (Coura, 2003).

Tema atual e muito importante é a doença de Chagas que ocorre em indivíduos imunossuprimidos, mormente com a disseminação da prática de transplantes de órgãos, e com a emergência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Epidemiologicamente, nos quadros de imunodepressão, existe manifestação de esquizotripanose pré-existente. A imunodepressão e a imunossupressão tendem a exacerbar a parasitemia, provocando, amiúde, miocardiopatia sub-aguda e meningoencefalite. Via de regra, as manifestações clínicas costumam ser graves e letais neste grupo de pacientes, sendo fundamental, como medida preventiva, confirmar o diagnóstico da doença de Chagas em pacientes com AIDS, em candidatos a transplantes ou em portadores de neoplasias, especialmente se houver antecedentes epidemiológicos (Dias, 2001).

Nas últimas duas décadas, o transplante de órgãos tem-se apresentado como opção terapêutica para portadores de doença cardíaca em fase avançada. Este procedimento encontra-se disponível há pelo menos 30 anos, mas a indicação mais freqüente do procedimento só ocorreu após o advento de

avanços que contribuíram para a viabilidade clínica do mesmo. Dentre esses fatores, pode-se citar o uso da ciclosporina como terapia imunossupressora, e o aperfeiçoamento da técnica de biópsia transvenosa de endomiocárdio, que permitiu tanto a detecção quanto o tratamento precoce de crises de rejeição do órgão transplantado (Kalil et al., 2000).

A possibilidade de reativação da infecção pelo *T. cruzi* foi demonstrada logo no início dos programas de transplante cardíaco (Stolf et al., 1987). Nestes casos, a reativação da infecção pelo *T. cruzi* pode se manifestar de duas maneiras: a primeira, na qual os pacientes apresentam parasitemias intensas, porém sem sintomas, e a segunda, que se caracterizaria por parasitemias intensas associadas a manifestações clínicas devidas à infecção pelo *T. cruzi* (Kalil et al., 2000).

1.3 Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas

A pesquisa do parasita no sangue do paciente com suspeita de doença de Chagas pode ser realizada tanto na fase aguda quanto nas reativações. Durante a fase aguda, caracterizada por parasitemia patente, e que costuma persistir pelo período de dois a quatro meses, deve ser priorizada a pesquisa do parasita por exame direto, a fresco ou por métodos de concentração. A reativação decorrente de imunodepressão causada por doença de base (AIDS)

ou tratamento imunossupressor, também é detectada pelos mesmos métodos diagnósticos (Luquetti e Rassi, 2000).

Pelas técnicas de concentração, tais como o micro-hematócrito, detecta-se o parasita no creme leucocitário que poderá ser visualizado por exame microscópico (ANEXO A). Pelo “Quantitative Buffy Coat” ou QBC (Becton-Dickinson, EUA), o parasita poderá ser visualizado em creme leucocitário após coloração pelo corante vital laranja de acridina, por imersão (600X), em microscópio de fluorescência (ANEXO A). Quando qualquer uma das duas técnicas de concentração for positiva, estará caracterizada a reativação da doença de Chagas (Luquetti e Rassi, 2000).

A detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* é o método de eleição para o diagnóstico etiológico da doença de Chagas na fase crônica, o que pode ser realizado por hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e por reação imunoenzimática ou ELISA (Luquetti e Rassi, 2000).

Durante a fase crônica, a pesquisa do parasita é indicada para confirmação diagnóstica em casos de exames sorológicos inconclusivos, para a quantificação da parasitemia após tratamento específico, e ainda para o controle de cura. O tipo de exame empregado nesta fase difere dos utilizados na fase aguda, e baseia-se na multiplicação do parasita em hemocultura, no sistema digestivo de triatomíneos no âmbito do xenodiagnóstico ou na amplificação de fragmentos de DNA específicos do parasita por PCR (Luquetti e Rassi, 2000).

Pela hemocultura, utilizada desde a década de 50, amostras sangüíneas procedentes de pacientes são cultivadas em meio LIT (“Liver Infusion Tryptose”), e examinadas por microscopia após 30 e 60 dias (ANEXO B).

Para a realização do xenodiagnóstico, método parasitológico indireto, alimenta-se 20 a 40 ninfas de triatomíneos com amostras sangüíneas procedentes de pacientes sob suspeita de doença de Chagas. Se o *T. cruzi* estiver presente, irá multiplicar-se no tubo digestório do inseto. Após 30 e 60 dias do repasto sangüíneo examina-se, por microscopia, amostras de fezes e do conteúdo abdominal total dos triatomíneos, respectivamente. A observação microscópica dos parasitas flagelados tem sido o método tradicional para avaliar a infecção em vetores (Dorn et al., 1999). O xenodiagnóstico, descrito inicialmente por Brumpt em 1914, constitui o teste de referência (padrão ouro) para o diagnóstico da doença de Chagas, registrando-se positividade que varia entre 9 a 87,5% (Portela-Lindoso, 2003). É indicado nos casos agudos, desde que os exames diretos tenham sido negativos. Romaña e Briones (1954) detectaram positividade nos exames de triatomíneos realizados em tempos mais precoces, iniciando a investigação do 6º ao 10º dia após o repasto sangüíneo. Muito embora Luquetti e Rassi (2000) tenham recomendado a realização do xenodiagnóstico com leituras microscópicas em tempos precoces nos casos de infecção aguda (muito raros em nosso meio), ou ainda nos casos de reativação, em que a pesquisa do parasita a fresco ou pelo QBC for negativa, não existe padronização com relação à periodicidade das leituras.

No Laboratório de Parasitologia do Instituto de Medicina Tropical da USP e Laboratório de Investigação Médica – Parasitologia (LIM/46) do HCFMUSP realiza-se o diagnóstico rotineiro da infecção pelo *T. cruzi* e o acompanhamento de pacientes crônicos, transplantados e portadores do HIV, para avaliação de reativações, por meio de exame direto, creme leucocitário, QBC, hemocultura, xenodiagnóstico e reações sorológicas (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI) e a hemaglutinação indireta (HAI) (ANEXO C). Este serviço é prestado ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo incluindo o Instituto do Coração - INCOR, à Real e Benemerita Sociedade Portuguesa de Beneficência e ao Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

O aprimoramento das técnicas de xenodiagnóstico e hemocultura contribuíram para aumentar a sensibilidade do diagnóstico. Sendo assim, são ainda consideradas como padrão no diagnóstico, particularmente quando as provas sorológicas são inconclusivas, o que ocorre frequentemente em pacientes imunodeprimidos ou imunossuprimidos, e na situação em que é preciso definir a cura após tratamento (Portela-Lindoso, 2003).

Na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), descrita em 1985 por Kary Mullis (Rolfs et al., 1992), ocorre amplificação de fragmentos oriundos do DNA genômico do parasita ou do DNA de minicírculos do cinetoplasto do parasita (kDNA). Este procedimento pode ser aplicado em amostras de sangue e fezes de triatomíneos (Breniere et al., 1995; Russomando et al., 1996), ou em outros materiais biológicos, com elevada sensibilidade (Luquetti e Rassi, 2000),

permitindo detectar o equivalente a um parasita ou frações do mesmo (Raiz Jr. et al., 2001), com ausência de reações cruzadas (Shikanai-Yasuda et al., 1996). A PCR já está sendo aplicada em estudos de epidemiologia molecular da doença de Chagas (Bar et al., 2002; Brito et al., 1995a; Espinoza-Gómez et al., 2002). Experimentos que utilizaram técnicas de hibridização, definiram a relação entre as cepas que infectam humanos e insetos, baseados na homologia do kDNA (Brito et al., 1995a).

A alta especificidade da PCR indica que ela pode ser utilizada como método de confirmação nos casos de diagnóstico sorológico inconclusivo, assim como no controle pós-terapêutico da doença de Chagas crônica, quando comparada às técnicas sorológicas e parasitológicas (Portela-Lindoso, 2003).

1.4 Comparação da PCR com o xenodiagnóstico, hemocultura, exame microscópico e técnicas sorológicas, na análise de amostras sangüíneas

Em muitos casos da doença, os títulos de anticorpos das sorologias não guardam relação direta com o estado clínico do paciente, como tem sido observado em recém-nascidos, indivíduos imunossuprimidos ou pacientes recebendo tratamento anti-parasitário (Galvão et al., 1993). Métodos diagnósticos parasitológicos como o exame microscópico de sangue, a

hemocultura e o xenodiagnóstico têm mostrado elevada sensibilidade na fase aguda da infecção, quando quantidade significativa de parasitas circulantes está presente, porém existe redução de 50% na sensibilidade durante a fase crônica (WHO, 1991).

Um painel de 114 amostras sanguíneas de pacientes chagásicos crônicos e não-chagásicos foi triado por Ávila et al. (1993) quanto à presença do *T. cruzi* pelo xenodiagnóstico, sorologia e PCR. Todos os pacientes com sorologia positiva tiveram PCR positiva, indicando 100% de sensibilidade da PCR. Neste estudo, todas as amostras positivas na sorologia e negativas pelo xenodiagnóstico foram positivas pela PCR.

Em estudo realizado no Rio de Janeiro, (Britto et al., 1995b) 95% dos pacientes previamente diagnosticados como chagásicos pelos métodos sorológicos foram positivos por PCR, enquanto que apenas 43% foram positivos pelo xenodiagnóstico.

A PCR também apresentou superioridade em relação às outras técnicas parasitológicas, em estudo realizado no Piauí, em pacientes com doença de Chagas crônica comprovada sorologicamente. Verificou-se positividade de 34% dos pacientes no xenodiagnóstico, 25,7% na hemocultura e 59,5% na PCR (Coura et al., 1996).

No estudo de Schijman et al. (2000), a PCR demonstrou maior sensibilidade que o exame microscópico para o diagnóstico precoce da reativação da doença de Chagas em pacientes transplantados cardíacos. Em um paciente, a PCR permitiu a detecção do DNA do parasita 41 dias antes da

observação da parasitemia e das lesões subcutâneas nodulares, demonstrando sua habilidade para a detecção precoce de parasitas circulantes, mesmo quando eles ainda não eram detectáveis pelos procedimentos parasitológicos convencionais.

Oitenta e cinco indivíduos soropositivos para a doença de Chagas apresentando xenodiagnóstico positivo, 37 na fase aguda e 48 na fase crônica, foram tratados com fármacos específicos. Quinze pacientes assintomáticos, porém cronicamente infectados, receberam placebo. O tratamento na fase aguda conduziu a uma PCR negativa em 73% dos casos, enquanto que o xenodiagnóstico foi negativo em 86%. Na fase crônica, a PCR foi negativa em 65% dos pacientes, enquanto que 83% apresentaram xenodiagnóstico negativo. Embora estes dados indiquem que a PCR seja mais sensível que o xenodiagnóstico para avaliar a cura após tratamento específico, a utilização de apenas um ensaio, analisando uma única amostra de sangue do paciente, não é suficiente para concluir de forma inequívoca que houve eliminação do parasita. Portanto, em estudos de seguimento terapêutico com testes periódicos e sistemáticos dos indivíduos, recomenda-se utilização de técnica molecular associada à sorologia (Britto et al., 2001).

Em estudo de Carvalho et al. (2003), o desempenho da PCR foi muito superior ao do xenodiagnóstico e da hemocultura, tendo sido sugerido que a PCR possa se tornar padrão ouro para detecção do parasita na fase crônica da doença de Chagas. Neste estudo, a parasitemia subpatente em macacos *Rhesus* infectados pelo *T. cruzi* foi detectada em todos os sete animais

estudados, 2 pela hemocultura (2/7), 3 pelo xenodiagnóstico (3/7) e 6 pela PCR (6/6).

Vera-Cruz et al. (2003) analisaram 39 amostras sanguíneas coletadas em área endêmica do México, em relação à presença de anticorpos específicos contra o *T. cruzi* por ELISA, e a detecção de DNA do parasita por PCR. Destas, 21 de 39 (53,84%) foram positivas por ELISA, e 33 de 39 (84,62%) foram positivas por PCR.

Salomone et al. (2003) investigaram 80 indivíduos procedentes de área endêmica que apresentavam sorologia negativa para doença de Chagas e verificaram que 12 (15%) tinham PCR positiva. Destes, três apresentavam sinais clínicos e sintomas que sugeriam cardiomiopatia chagásica.

Em estudo que avaliou a utilidade da PCR para o diagnóstico precoce da reativação do *T. cruzi*, uma vez que tanto a especificidade quanto a sensibilidade dos métodos parasitológicos e sorológicos foram considerados inadequados para a detecção de baixas parasitemias em indivíduos com imunossupressão, a PCR foi capaz de detectar *T. cruzi*, em dois pacientes, a partir de amostras de sangue periférico, 30 dias antes do aparecimento de sinais e sintomas sugestivos de reativação da doença (Maldonado et al., 2004).

Apt et al. (2005) compararam a PCR realizada em amostras de sangue periférico dos pacientes com a PCR acoplada ao xenodiagnóstico, e observaram detecção de maior número de casos na PCR realizada com o mesmo material utilizado para o exame microscópico do xenodiagnóstico, provavelmente devido à multiplicação do parasita que ocorre dentro do vetor.

Neste estudo, 3 de 109 pacientes foram positivos apenas após esta combinação.

Pelo que foi exposto, a PCR parece constituir instrumento diagnóstico valioso, notadamente no caso de doenças infecciosas graves, devido à sua capacidade para detectar agentes infecciosos com maior sensibilidade e especificidade (Silber et al., 1997), sem necessidade de que os mesmos se encontrem viáveis na amostra biológica. Na doença de Chagas, a disponibilidade da PCR é importante para o diagnóstico nos pacientes com sistema imunológico comprometido, e ainda para monitorar a terapêutica (Silber et al., 1997). No caso dos recém-nascidos, o diagnóstico é essencial para a introdução precoce do tratamento anti-parasitário (Virreira et al., 2003).

1.5 Comparação da PCR acoplada ao exame microscópico realizado no âmbito do xenodiagnóstico, na análise de amostras procedentes de triatomíneos

Segundo Silber et al. (1997), a PCR poderia ser utilizada tanto para a detecção de DNA do *T. cruzi* nas fezes do vetor, contribuindo para o incremento da positividade do xenodiagnóstico, quanto para a obtenção de dados epidemiológicos mais confiáveis com relação aos insetos infectados em áreas endêmicas.

Na Bolívia, ao examinarem material fecal do *T. infestans*, quanto à presença do *T. cruzi*, pelo exame microscópico (EM) e pela PCR, Breniere et al. (1995) observaram concordância entre as duas técnicas em 85,3% dos casos. Surpreendentemente, a microscopia detectou 92,1% de positividade, e a PCR 82,7%. No entanto, a PCR foi capaz de identificar o *T. cruzi* em algumas espécies selvagens, tais como o *Rhodnius pictipes*, *Eratyrus mucronatus* e *Triatoma sordida*, o que não ocorreu pelo exame microscópico.

Russomando et al. (1996) na Argentina, detectaram o *T. cruzi* nas fezes do *T. infestans*, pela PCR, dois dias após o repasto sanguíneo, em macacos cronicamente infectados e apresentando baixa parasitemia.

Em estudo realizado no Brasil, ninfas do *T. infestans* alimentadas em pacientes na fase crônica da doença, ao serem examinadas pela PCR e exame microscópico mostraram maior sensibilidade da PCR (Shikanai-Yasuda et al., 1996).

No estudo de Dorn et al. (1999) na Guatemala, a sensibilidade da PCR e da microscopia para o *T. cruzi*, nas amostras do conteúdo retal do *Triatoma dimidiata*, não apresentou diferenças significativas. Contudo, para o *R. prolixus* a PCR mostrou sensibilidade superior.

Machado et al. (2000), mostraram concordância entre o exame microscópico do *T. cruzi* nas fezes e a PCR, até 60 dias após infecção do *Dipetalogaster maximus*. No entanto, no estudo de Dorn et al. (2001) com o *Rhodnius prolixus*, a PCR foi superior ao exame microscópico mostrando taxa de infecção de 78,6% contra 42,5%, respectivamente.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Diante de informações conflitantes, foi delineado o presente estudo com o objetivo de analisar e comparar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o exame microscópico (EM) realizado no âmbito do xenodiagnóstico, em material do tubo digestório do *Triatoma infestans*, após repasto sanguíneo em camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* em dois modelos de infecção, de alta e de baixa parasitemia. Contrariamente ao que é realizado rotineiramente nos protocolos de xenodiagnóstico utilizados nos laboratórios especializados, que realizam leituras 30 e 60 dias após a infecção experimental, decidimos realizar EM e PCR em tempos mais precoces, além dos convencionais.

3. HIPÓTESE DO ESTUDO

3. HIPÓTESE DO ESTUDO

A hipótese deste estudo é que a multiplicação do *T. cruzi* que ocorre no trato digestório do triatomíneo, associada ao poder de amplificação exponencial do DNA parasitário obtido por PCR, aumentaria as chances de detecção do parasita. Portanto, a combinação do xenodiagnóstico com a PCR permitiria a detecção mais precoce do parasita, durante a fase aguda da doença e nos casos de reativação em pacientes imunossuprimidos.

4. OBJETIVOS

4.OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresenta vantagens em termos diagnósticos para a doença de Chagas quando comparada ao exame microscópico (EM), como exame complementar ao xenodiagnóstico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Comparar a positividade da PCR com o EM na detecção da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* em material do trato digestório de *Triatoma infestans*, alimentados com sangue de camundongos infectados experimentalmente e com alta carga parasitária, no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia após o repasto sanguíneo.

4.2.2 Comparar a positividade da PCR com o EM na detecção da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* em material do trato digestório de *Triatoma*

infestans, alimentados com sangue de camundongos infectados experimentalmente e com baixa carga parasitária, no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia após o repasto sanguíneo.

5. ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

5. ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

Este estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética e Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical da USP, do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, do Departamento de Pediatria da FMUSP e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP (inscrito sob o número de Protocolo de Pesquisa 1083/04).

6. MATERIAL E MÉTODOS

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 *Procedência dos triatomíneos*

A cepa do *T. infestans*, oriunda de Caçapava do Sul – RS, foi cedida pelo Laboratório de Triatomíneos e Culicídeos da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. A criação e manutenção dos triatomíneos no Laboratório de Parasitologia do IMT - USP e LIM/46, ocorre em estufa a 28°C, com 70 a 80% de umidade, segue protocolo similar ao preconizado por Garcia e Azambuja (2000). A alimentação dos adultos ocorre semanalmente, e das ninfas quinzenalmente, em galinhas, que são animais refratários ao *T. cruzi* (Pessoa e Martins, 1985), garantindo-se assim que todos os insetos estivessem livres de contaminação pelo protozoário. Toda semana são coletados ovos e ninfas dos recipientes dos adultos para manutenção da criação.

Neste estudo, a alimentação das ninfas dos triatomíneos foi suspensa 15 a 20 dias antes do repasto nos camundongos Balb/C.

6.2 Procedência da cepa Y do *T. cruzi*

A cepa Y do *T. cruzi* foi isolada em 1950 por Silva e Nussenzweig em paciente que se encontrava na fase aguda da doença de Chagas, residente na região de Marília – SP (Martins et al., 2003). Esta cepa é mantida no Laboratório de Parasitologia do IMT - USP e LIM/46, por meio de repiques semanais em camundongos Balb/C. Ela apresenta predomínio de formas delgadas e macrofagotropismo na fase aguda da infecção, e se caracteriza por apresentar pico parasitário no 7º dia após infecção nos camundongos Balb/C. A cepa Y foi classificada no biotipo tipo I, grupo *T. cruzi* II, associado à doença humana e zimodema Z2 (Martins et al., 2003; Andrade, 1985).

6.3 Procedência dos camundongos Balb/C

O camundongo Balb/C (*Mus domesticus domesticus*), isogênico, se configura na linhagem mais utilizada em estudos experimentais. É descrito como um dos animais mais suscetíveis à doença de Chagas, e o modelo Balb/C - cepa Y já foi utilizado por outros autores (Araújo-Jorge, 2000). Os animais utilizados neste estudo foram procedentes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, eram todos do sexo masculino, com

aproximadamente 20 gramas de peso, e foram mantidos no Biotério do Laboratório de Parasitologia do IMT – USP e LIM/46, até sua utilização.

6.4 Protocolo de infecção dos camundongos, com a cepa Y, do *T. cruzi*

Os camundongos Balb/C foram infectados com a cepa Y do *T. cruzi* (Fernandes e Campbell, 2000), determinando-se a carga parasitária para infecção, após contagem em câmara de Neubauer. O acompanhamento da parasitemia, após coleta sanguínea da cauda do animal, foi realizado entre o 2º e o 4º dia, pelo método de Brener (Castro et al., 2000), que consiste na multiplicação do número de formas, quantificadas em 50 campos (lamínula 22x22), pelo fator do microscópio (Nikon), obtendo-se então o número de parasitas em 5 µl de sangue do roedor. Nos dias posteriores, entre o 4º e o 7º dia, com o aumento da parasitemia, a contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

O grupo de camundongos que deveria apresentar alta parasitemia foi infectado com 10^4 formas de *T. cruzi* (Castro et al., 2000; Andrade, 1985) e aquele que deveria apresentar parasitemia mais baixa, com 10^3 formas (Coura, 2000). Os triatomíneos alimentaram-se nos camundongos com alta parasitemia no 7º dia pós-infecção, quando os roedores apresentavam aproximadamente $1,6 \times 10^3$ formas/ 5 µl de sangue, e naqueles com parasitemia mais baixa, no 4º

dia pós-infecção, quando os animais apresentavam aproximadamente 5 parasitas/ 5µl (Coura, 2000).

6.5 Protocolo de alimentação dos triatomíneos nos camundongos Balb/C, infectados com a cepa Y do *T. cruzi*

As ninfas de 3º e 4º estádios do *T. infestans* foram alimentadas em camundongos Balb/C contidos em rede, após anestesia, por via intramuscular, com 0,1 mg/kg de cloridrato de xilazina, Rompun (Bayer S.A. - Saúde Animal) e 6 mg/kg de cloridrato de cetamina (Ketamina, Parke-Davis). Após cerca de 40 minutos de repasto sanguíneo, os roedores eram retirados da rede, e em seguida sacrificados em câmara de CO₂ (Prostar). As ninfas de triatomíneos eram guardadas em estufa a 28°C e umidade de 70 a 80% até o dia da análise do conteúdo abdominal, por EM e pela PCR. Os animais controle foram alimentados segundo o mesmo protocolo, porém em camundongos não infectados.

O manejo dos animais seguiu o código de conduta do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2006).

6.6 Definição dos períodos de exame dos triatomíneos por EM e PCR

Nos dois modelos iniciou-se a coleta de fezes ou material do tubo digestório dos triatomíneos logo no 1º dia após o repasto sangüíneo. A decisão de realizar avaliação do 1º ao 5º dia após o repasto sangüíneo foi baseada nos resultados descritos por Romãña e Briones, em 1954, e tomada com o intuito de favorecer o diagnóstico precoce nos pacientes com suspeita de reativação da doença de Chagas, após imunossupressão. Decidiu-se manter as leituras clássicas realizadas no 30º e 60º dia para o diagnóstico dos pacientes com doença crônica, por ser o padrão adotado no xenodiagnóstico, e foram acrescentados tempos intermediários (10º, 15º, 20º e 25º dia), devido à escassez de informações na literatura sobre a parasitemia neste período. Os animais controle foram avaliados seguindo o mesmo protocolo.

6.7 Triatomíneos, EM, PCR e falso-positivo

Para evitar resultados falso-positivos pelo EM e/ou PCR, optou-se pela obtenção de material do trato digestório dos triatomíneos inicialmente do grupo de insetos não-infectados, e posteriormente dos triatomíneos infectados, tomando-se o cuidado de realizar limpeza das pinças com álcool 70 GL e a

seguir submetê-las à chama do bico de Bunsen, entre o manuseio dos triatomíneos.

6.8 Exame microscópico (EM) das amostras procedentes do tubo digestório de triatomíneos

Para a realização da microscopia óptica, entre lâmina e lamínula (20x20), no aumento de 400X, realizou-se retirada do conteúdo abdominal daqueles triatomíneos que não defecavam espontaneamente. Metade do conteúdo procedente da extrusão abdominal ou da gota fecal em volume variando de 2 a 10 µl foi misturado a 10 µl de solução fisiológica, e submetido ao EM. A leitura ocorreu imediatamente após a obtenção da amostra, evitando-se assim o seu ressecamento.

6.9 Protocolo de extração do DNA do *T. cruzi* das amostras procedentes do tubo digestório de triatomíneos

A outra metade do conteúdo procedente da extrusão abdominal ou das fezes foi misturada a 50 µl de água destilada estéril apirrogênica e submetida à extração de DNA. Após homogeneização, a mistura foi levada ao banho-maria seco (modelo QBT2 – Grant, EUA), a 100° C, por 20 minutos. Todas as

amostras foram congeladas a -20° C até sua utilização. Posteriormente, foram submetidas à centrifugação de 12.000rpm, por 5 minutos, em centrífuga refrigerada (Centrifuge 5417 – Eppendorf, Germany). Os sobrenadantes contendo o DNA em suspensão foram submetidos à quantificação espectrofotométrica em luz ultravioleta (comprimento de onda de 260 nm), para a quantificação do DNA nas amostras (Spectrophotometer DU -70, Beckman, EUA).

6.10 Medidas preconizadas para realização da PCR

Todas as medidas preconizadas para minimizar os riscos de contaminação da PCR foram adotadas neste estudo. Para minimizar as fontes de contaminação, preconiza-se a delimitação de quatro áreas de trabalho no laboratório de amplificação de ácidos nucleicos: a sala de preparo de reagentes, a de preparo de amostras, a de amplificação e a de detecção dos produtos de amplificação. Cada área deve ter equipamentos, reagentes e materiais próprios, de forma que não haja troca de materiais entre as áreas de trabalho. O acesso às áreas individuais deve seguir fluxo que direcione o trabalho da área menos contaminada para a área mais contaminada, isto é, da área de reagentes para a de extração, e a seguir da extração para as áreas de amplificação (Verlengia et al., 2000). Todas estas medidas foram adotadas no presente estudo, incluindo a compartimentalização do espaço físico em 3 áreas

(reagentes, extração e amplificação), uso de ponteiros com barreira anti-aerosol, materiais descartáveis livres de DNase e RNase, micropipetas específicas de cada área, luvas descartáveis e trocadas com frequência, reagentes com lote controlado e divididos em alíquotas de volume reduzido, para evitar vários ciclos de congelamento e descongelamento.

6.11 Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados em sequência nuclear repetitiva do genoma do *T. cruzi*, denominada TCZ, de 195 pares de base (Moser et al., 1989) e produzem fragmento amplificado de 144 pares de base. Foram selecionados e testados no LIM/36. São eles: sense F2: 5' – TGC ACT CGG CTG ATC GTT TTC GAG – 3' e anti-sense B3: 5'– AGG GTT GTT TGG TGT CCA GTG TGT G – 3'. Os níveis de sensibilidade atingidos foram equivalentes a centésimos de parasita (2 fg), tendo em vista que cada qual possui genoma de 220 fentogramas (Raiz Jr. et al., 2001).

6.12 Protocolo da PCR em amostras procedentes do tubo digestório

Um micrograma (1 μ g) de DNA de cada amostra foi adicionado aos reagentes da PCR, para completar volume final de 50 μ l: 200 μ M de deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP), ou seja, de dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,4 μ M de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,5 mM de $MgCl_2$, 2,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA), 25 mM do co-solvente $(NH_4)_2SO_4$, em tampão de reação com pH 8,0, contendo 200 mM de TrisHCl e 500 mM de KCl. As temperaturas e ciclos de amplificação foram (Raiz Jr. et al., 2001): após uma etapa de desnaturação inicial de 5 minutos a 95° C, foram realizados 40 ciclos de amplificação de 1 minuto a 95° C (desnaturação), 1 minuto a 55° C (anelamento) e 1 minuto a 72° C (extensão), seguidos de uma extensão final de 5 minutos a 72° C, em termociclador T3 Thermocycler (Biometra, Germany). Cada rotina incluiu um controle positivo contendo DNA de *T. cruzi* e 2 tubos como controles negativos contendo água estéril, um da fase da adição dos reagentes, e outro da fase de adição das amostras. Dez microlitros de cada amostra amplificada foram submetidos à eletroforese horizontal (Horizon HE-58, Gibco), em gel de agarose a 3% (Sigma, EUA) em tampão TAE (1X) a 100 V. Os géis foram posteriormente corados com brometo de etídio (0,5 ng/ml, Pharmacia-Biotech), e visualizados em sistema de foto-

documentação com luz ultravioleta (Rainbow CCTV RM892 e VO3 8195 – Vilber Lourmat, France). A amplificação deveria revelar fragmento específico do genoma nuclear de *T. cruzi* com peso molecular de 144 pares de base.

Todas as amostras foram testadas para certificar ausência de inibidores da amplificação, tais como derivados da degradação da hemoglobina (Dorn et al., 2001). Assim, a cada amostra foi adicionado o DNA do *T. cruzi* (controle positivo) e submetido ao PCR.

Aquelas amostras que inicialmente revelaram resultado negativo por PCR foram retestadas em triplicata. Estas repetições foram necessárias devido ao fato da seqüência alvo da amplificação (TCZ), embora extremamente repetitiva, ocorrer em “tandem”, isto é, todas em um mesmo cromossomo e contíguas. Esta característica faz com que exista a possibilidade do fenômeno do tipo “tudo ou nada”, quando apenas uma fração do DNA que foi extraído é analisada. Testes em triplicata de uma mesma amostra de DNA deveriam minimizar este efeito. Para calcular a porcentagem de amostras positivas por PCR consideramos a somatória obtida na 1ª amplificação e nas repetições (triplicata).

6.13 Teste de especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores

Para verificar a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da seqüência TCZ, pesquisou-se no Gene Bank (NCBI, 2005) o grau de homologia

dos primers com o DNA do *Trypanosoma rangeli* e ainda com espécies de *Leishmania*.

Posteriormente, testou-se amostras de DNA na concentração de 1µg a 10 pg do *T. rangeli sangustini*. Também foram testadas amostras na concentração de 1µg a 100 ng de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*.

6.14 FASE 1 – Modelo de alta parasitemia. Comparação da PCR com o EM na detecção do *T. cruzi* em amostras procedentes do tubo digestório do *T. infestans* infectados em camundongos com alta parasitemia

Cento e dez ninfas do *T. infestans*, de terceiro e quarto estágio, foram alimentadas em camundongos com parasitemia de aproximadamente $1,6 \times 10^3$ parasitas/5 µl (Figura 2). Como controle, 110 ninfas de triatomíneos, nas mesmas condições, foram alimentadas em camundongos não infectados. As ninfas do grupo infectado foram separadas em 11 caixas, cada uma contendo 10 triatomíneos. Do grupo de 110, de 10 em 10, foram examinadas após 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 dias por EM e por PCR. O EM, a extração do DNA e o protocolo da PCR seguiram procedimentos anteriormente descritos. As ninfas não infectadas foram separadas em 11 caixas, cada uma contendo 10, e

examinadas do mesmo modo. O número de ninfas analisado em cada grupo (n=10) foi determinado de forma arbitrária, com base na produção total de ninfas do Laboratório de Parasitologia do IMT – USP (LIM/46).

Figura 2 - Representação esquemática das etapas realizadas no projeto de pesquisa. Na Fase 1 os camundongos infectados apresentavam alta parasitemia

6.15 FASE 2 – Modelo de baixa parasitemia. Comparação da PCR com o EM na detecção do *T. cruzi* em amostras procedentes do tubo digestório do *T. infestans* infectados em camundongos com baixa parasitemia

Na segunda fase do estudo, 220 ninfas do *T. infestans*, de terceiro e quarto estádios foram infectadas pela cepa Y, do *T. cruzi*, em camundongos que apresentavam aproximadamente 5 parasitas/5 µl. Desta feita, as ninfas do grupo infectado foram separadas em 11 caixas, cada uma contendo 20. Do grupo de 220, de 20 em 20, foram examinadas após 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 dias. Como controle, 55 ninfas de triatomíneos, nas mesmas condições, foram alimentadas em camundongos não infectados. As ninfas do grupo não infectado foram separadas em 11 caixas, cada uma contendo 5 e examinadas de modo idêntico ao que foi descrito na Fase 1. O EM, a extração do DNA e o protocolo da PCR seguiram procedimentos já descritos.

Na 2ª Fase do estudo, aumentou-se a amostragem dos triatomíneos infectados, na tentativa de minimizar os efeitos das mortes de triatomíneos que ocorreram na 1ª fase do estudo, e deveriam ocorrer também na 2ª fase, evitando-se trabalhar com casuística reduzida. Para tanto, houve planejamento no Laboratório de Parasitologia – IMT – USP (LIM 46) para aumentar a

produção de ninfas. E como não houve casos falso-positivos no grupo controle da 1ª fase, delineou-se nesta fase um menor número de insetos.

Figura 3 - Representação esquemática das etapas realizadas no projeto de pesquisa. Na Fase 2 os camundongos infectados apresentavam baixa parasitemia

6.16 Análise estatística

A análise estatística foi realizada agrupando-se os resultados obtidos do 1º ao 5º dia (tempos precoces), do 10º ao 25º dia (tempos intermediários), e no 30º e no 60º dia (tempos tardios, que coincidem com as leituras padronizadas do xenodiagnóstico). Comparou-se o EM com a PCR nos três agrupamentos, tanto no modelo de alta parasitemia, quanto no de baixa parasitemia utilizando-se o teste de McNemar (Dorak, 2006), adotando-se $p < 0,05$ como nível de significância. Os resultados obtidos pelos dois procedimentos foram comparados quanto ao grau de discordância. A hipótese nula seria a de que não existiriam diferenças entre os dois testes diagnósticos (EM e PCR). Também utilizou-se o mesmo procedimento para analisar se haveria realmente necessidade da repetição da PCR em triplicata quando o primeiro resultado era negativo. Neste caso, agrupou-se do 1º ao 60º dia, tanto no modelo de alta parasitemia, quanto no de baixa parasitemia.

7. RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1 Análise de amostras procedentes do tubo digestório (fezes e conteúdo abdominal)

Em estudo preliminar, amostras de fezes emitidas espontaneamente e aquelas procedentes do conteúdo abdominal foram analisadas de acordo com o mesmo protocolo, e não havendo diferenças entre os resultados obtidos a partir dos dois tipos de amostra, os resultados foram considerados globalmente como amostras do tubo digestório dos triatomíneos. Os resultados são, portanto, oriundos da somatória dos dois tipos de amostra.

7.2 Amplificação do fragmento de 144 pares de base

Na Figura 4 observa-se o padrão de positividade pela PCR, ou seja, a amplificação do fragmento de 144 pares de base.

Figura 4 - Detecção de DNA do *T. cruzi* por PCR em amostras procedentes do tubo digestório de triatomíneos

7.3 Teste de especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ

Para verificar a especificidade dos iniciadores da sequência TCZ, pesquisou-se no Gene Bank (NCBI, 2005) a existência de homologia de sequência com o DNA genômico de *Trypanosoma rangeli* e com espécies de *Leishmania*, não tendo sido observada homologia com ambos (ANEXOS D, E, F e G).

A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores foi testada por meio de amplificação das amostras de DNA de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* na concentração de 1 µg, conforme Tabela 1 e Figura 5, não tendo ocorrido amplificação. No entanto, amostras de DNA do *T. rangeli sangustini* foram amplificadas nas concentrações de 1 µg a 10 ng, o que não ocorreu em concentrações mais baixas, de 1 ng até 10 pg (Tabela 1 e Figura 6).

Tabela 1 - Teste de especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ com o DNA de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *T. rangeli* em diferentes concentrações

	1000ng	100ng	10 ng	1ng	100pg	10pg
<i>L. amazonensis</i>	-	-	NT	NT	NT	NT
<i>L. braziliensis</i>	-	-	NT	NT	NT	NT
<i>L. chagasi</i>	-	-	NT	NT	NT	NT
<i>T. rangeli</i>	+	+	+	-	-	-

NT=não testado

Figura 5 - Teste de especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ com o DNA de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*

Figura 6 - Teste de especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ com o DNA de *T. rangeli sangustini* em diferentes concentrações

7.4 Análise estatística dos resultados obtidos após triplicata

Ao agrupar-se, no modelo de alta parasitemia, todos os tempos estudados, isto é, do 1º ao 60º dia, concluiu-se que após a realização das triplicatas a porcentagem de resultados positivos por PCR foi superior em relação àquela obtida após uma única amplificação, sendo assim rejeitada a hipótese nula, de que não haveria diferenças entre a porcentagem de resultados positivos por PCR após a realização das triplicatas e aquela obtida

após a primeira amplificação. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), de acordo com o procedimento de McNemar (Anexo H). O mesmo teste foi aplicado no modelo de baixa parasitemia, também do 1º ao 60º dia, e resultado similar ao encontrado para o modelo de alta parasitemia foi verificado, isto é, a triplicata aumentou a porcentagem de amplificações positivas, sendo a diferença entre a porcentagem de positivos após o primeiro PCR e depois da realização das triplicatas estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Anexo I).

7.5 Resultados da 1ª Fase – Modelo de alta parasitemia

Todas as amostras procedentes do tubo digestório dos insetos alimentados em camundongos não infectados pelo *T. cruzi*, isto é, as 110 ninfas de triatomíneos, foram negativas tanto pela PCR como pelo EM.

Todas as amostras testadas quanto à presença de inibidores, por meio da adição do DNA parasitário, amplificaram o fragmento de 144 pb.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 2, referente aos tempos precoces, na Tabela 3, referente aos tempos intermediários, na Tabela 4, referente aos tempos tardios, e na Figura 7, referente a todos os tempos, a PCR detectou mais triatomíneos positivos do que o EM, em 10 dos 11 tempos estudados no modelo de alta parasitemia, existindo equivalência da positividade obtida pelas duas técnicas apenas no 4º dia (Tabela 2).

Nos tempos precoces (1º ao 5º dia) após o repasto sanguíneo, 75% (6/8), 60% (6/10), 50% (5/10), 40% (4/10) e 60% (6/10) das amostras procedentes do tubo digestório foram positivas pela PCR, enquanto que pelo EM, estes valores foram de 50% (4/8), 30% (3/10), 30% (3/10), 40% (4/10) e 30% (3/10), respectivamente. O procedimento de McNemar (Anexo J) mostrou haver discordância entre os resultados, com superioridade da PCR em relação ao EM, e que esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na Tabela 3, verificou-se que nos tempos intermediários, isto é, no 10º, 15º, 20º e 25º dias, a PCR apresentou positividade de 90% (9/10), 100% (10/10), 88,9% (8/9) e 88,9% (8/9), respectivamente, enquanto que pelo EM a positividade foi de 60% (6/10), 50% (5/10), 55,6% (5/9) e 33,3% (3/9). Aplicado aos dados da Tabela 3, o teste de McNemar mostrou que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a PCR e o EM e, portanto a PCR detecta, neste grupo, mais positivos do que o EM (Anexo K).

No 30º dia, 100% (10/10) das amostras foram positivas pela PCR, enquanto que o EM apresentou positividade de 70% (7/10). Noventa por cento (9/10) das amostras procedentes do tubo digestório dos triatomíneos foram positivas pela PCR no 60º dia, enquanto apenas 20% (2/10) foram positivas pelo EM (Tabela 4). Aplicado aos resultados apresentados na Tabela 4, o teste de McNemar mostrou que houve diferenças estatisticamente significantes entre a PCR e o EM, com superioridade da primeira ($p < 0,05$) (Anexo L).

Dos 11 tempos de coleta analisados após o repasto sanguíneo no modelo de alta parasitemia, a PCR foi superior ao EM em 10; sendo que apenas no 4º dia houve equivalência das duas técnicas (Figura 7).

Tabela 2 - Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do *T. cruzi* em amostras procedentes do tubo digestório do *T. infestans*. Os insetos foram infectados em camundongos com alta parasitemia, e o material do tubo digestório dos mesmos foi analisado 1, 2, 3, 4 e 5 dias após o repasto sangüíneo

GRUPO/ DIAS APÓS- REPASTO SANGÜÍNEO	EM - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	PCR - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	REPETIÇÃO PCR (TRIPLICATA). Nº POSITIVOS = SOMATÓRIA DAS AMPLIFICAÇÕES/ TOTAL (%)
1 / 1º	4/8 (50,0)	5/8 (62,5)	6/8 (75,0)
2 / 2º	3/10 (30,0)	5/10 (50,0)	6/10 (60,0)
3 / 3º	3/10 (30,0)	4/10 (40,0)	5/10 (50,0)
4 / 4º	4/10 (40,0)	3/10 (30,0)	4/10 (40,0)
5 / 5º	3/10 (30,0)	4/10 (40,0)	6/10 (60,0)
Total de amostras	17/48 (35,4)	21/48 (43,8)	27/48 (56,3)

Tabela 3 - Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do *T. cruzi* em amostras procedentes do tubo digestório do *T. infestans*. Os insetos foram infectados em camundongos com alta parasitemia, e o material do tubo digestório dos mesmos foi analisado 10, 15, 20 e 25 dias após o repasto sangüíneo

GRUPO/ DIAS APÓS- REPASTO SANGÜÍNEO	EM - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	PCR - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	REPETIÇÃO PCR (TRIPLICATA) Nº POSITIVOS = SOMATÓRIA DAS AMPLIFICAÇÕES/ TOTAL (%)
6 / 10º	6/10 (60,0)	7/10 (70,0)	9/10 (90,0)
7 / 15º	5/10 (50,0)	8/10 (80,0)	10/10 (100,0)
8 / 20º	5/9 (55,6)	8/9 (88,9)	8/9 (88,9)
9 / 25º	3/9 (33,3)	6/9 (66,7)	8/9 (88,9)
Total de amostras	19/38 (49,8)	29/38(76,3)	35/38 (92,1)

Tabela 4 - Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do *T. cruzi* em amostras procedentes do tubo digestório do *T. infestans*. Os insetos foram infectados em camundongos com alta parasitemia, e o material do tubo digestório dos mesmos foi analisado 30 e 60 dias após o repasto sanguíneo

GRUPO/ DIAS APÓS- REPASTO SANGÜÍNEO	EM - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	PCR - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	REPETIÇÃO PCR (TRIPLICATA) Nº POSITIVOS = SOMATÓRIA DAS AMPLIFICAÇÕES/ TOTAL (%)
10 / 30º	7/10 (70,0)	8/10 (80,0)	10/10 (100,0)
11 / 60º	2/10 (20,0)	6/10 (60,0)	9/10 (90,0)
Total de amostras	9/20 (45,0)	14/20 (70,0)	19/20 (95,0)

Figura 7 – Comparação da PCR com o EM em amostras procedentes do tubo digestório de triatomíneos no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia após o repasto sanguíneo em camundongos infectados pelo *T. cruzi* (alta parasitemia)

Quando a PCR foi comparada com o EM em relação à positividade de amostras procedentes do tubo digestório dos 106 triatomíneos infectados em camundongos com alta parasitemia (Tabela 5), pode-se observar que houve concordância entre as duas técnicas em 40,6% dos casos (os dois testes positivos), e concordância em 21,7% dos casos em relação à detecção de amostras negativas. Em 35,8% dos casos, as amostras foram positivas pela PCR e negativas ao EM, enquanto que em apenas 1,9% dos casos as amostras foram negativas pela PCR e positivas pelo EM.

Tabela 5 – Comparação da detecção da cepa Y de *T. cruzi* pela PCR e pelo EM em amostras procedentes do tubo digestório de 106 triatomíneos infectados em camundongos com alta parasitemia

	PCR positiva	PCR negativa	Total
EM positivo	43 (40,6%)	2 (1,9%)	45
EM negativo	38 (35,8%)	23 (21,7%)	61
Total	81	25	106

7.6 - Resultados da 2ª Fase – Modelo de baixa parasitemia

Todas as amostras procedentes dos insetos alimentados em camundongos não infectados pelo *T. cruzi*, isto é, as 55 ninfas de triatomíneos desta segunda fase do estudo foram negativas tanto pela PCR como pelo EM nas amostras procedentes do tubo digestório.

Todas as amostras testadas quanto à presença de inibidores, por meio da adição do DNA parasitário, amplificaram o fragmento de 144 pb.

Conforme a Tabela 6 referente aos resultados dos tempos precoces, Tabela 7, referente aos tempos intermediários, Tabela 8, referente aos tempos tardios, e Figura 8, referente a todos os tempos, a PCR detectou mais triatomíneos positivos do que o EM, em todos os tempos estudados no modelo de baixa parasitemia.

De acordo com a Tabela 6, comparando-se a PCR com o EM, apenas a PCR foi positiva no 1º dia após o repasto sanguíneo, apresentando 40% (8/20) de positividade. No 2º, 3º, 4º e 5º dia a PCR apresentou positividade superior, com valores de 55% (11/20), 40% (8/20), 70% (14/20) e 63,2% (12/19), enquanto que o EM apresentou positividade de 5% (1/20), 5% (1/20), 15% (3/20) e 15,8% (3/19), respectivamente. O teste de McNemar mostrou que houve diferenças estatisticamente significantes entre a positividade obtida pelo EM e pela PCR; com superioridade da última ($p < 0,05$) (Anexo M).

Nos tempos intermediários, isto é, no 10º, 15º, 20º e 25º dias a superioridade da PCR se manteve: 60% (12/20), 65% (13/20), 52,6% (10/19) e 60% (12/20), respectivamente, em relação aos 25% (5/20), 25% (5/20), 31,6% (6/19) e 30% (6/20) do EM (Tabela 7). A PCR foi capaz de detectar cerca de duas vezes mais casos que o EM. O teste de McNemar aplicado aos resultados da Tabela 7 evidenciou diferença estatisticamente significativa entre o EM e a PCR; com superioridade da última ($p < 0,05$) (Anexo N).

Os resultados apresentados na Tabela 8 mostraram que a PCR foi positiva em 78,9% e 68,4% das amostras de tubo digestório coletadas no 30º e 60º dias, após o repasto sangüíneo, enquanto que o EM foi positivo em 36,8% e 36,8%, respectivamente. Aplicado o teste de McNemar aos resultados apresentados nesta tabela, houve diferença estatisticamente significativa entre o EM e a PCR; com superioridade da última ($p < 0,05$) (Anexo O).

Tabela 6 - Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do *T. cruzi*, em amostras procedentes do tubo digestório do *T. infestans*. Os insetos foram infectados em camundongos com baixa parasitemia, e o material do tubo digestório dos mesmos foi analisado 1, 2, 3, 4 e 5 dias após o repasto sangüíneo

GRUPO/ DIAS APÓS REPASTO SANGÜÍNEO	EM - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	PCR - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	REPETIÇÃO PCR (TRIPLICATA) Nº POSITIVOS = SOMATÓRIA DAS AMPLIFICAÇÕES/ TOTAL (%)
1 / 1º	0/20 (0)	8/20 (40,0)	8/20 (40,0)
2 / 2º	1/20 (5,0)	11/20 (55,0)	11/20 (55,0)
3 / 3º	1/20 (5,0)	8/20 (40,0)	8/20 (40,0)
4 / 4º	3/20 (15,0)	12/20 (60,0)	14/20 (70,0)
5 / 5º	3/19 (15,8)	11/19 (57,9)	12/19 (63,2)
Total de amostras	8/99 (8,1)	50/99 (50,5)	53/99 (53,5)

Tabela 7 - Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do *T. cruzi*, em amostras procedentes do tubo digestório do *T. infestans*. Os insetos foram infectados em camundongos com baixa parasitemia, e o material do tubo digestório dos mesmos foi analisado 10, 15, 20 e 25 dias após o repasto sangüíneo

GRUPO/ DIAS APÓS REPASTO SANGÜÍNEO	EM - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	PCR - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	REPETIÇÃO PCR (TRIPLICATA) Nº POSITIVOS = SOMATÓRIA DAS AMPLIFICAÇÕES/ TOTAL (%)
6 / 10º	5/20 (25,0)	11/20 (55,0)	12/20 (60,0)
7 / 15º	5/20 (25,0)	9/20 (45,0)	13/20 (65,0)
8 / 20º	6/19 (31,6)	9/19 (47,4)	10/19 (52,6)
9 / 25º	6/20 (30,0)	11/20 (55,0)	12/20 (60,0)
Total de amostras	22/79 (27,8)	40/79 (50,6)	47/79 (59,5)

Tabela 8 - Comparação da PCR com o EM na detecção da cepa Y do *T. cruzi*, em amostras procedentes do tubo digestório do *T. infestans*. Os insetos foram infectados em camundongos com baixa parasitemia e o material do tubo digestório dos mesmos foi analisado 30 e 60 dias após o repasto sangüíneo

GRUPO/ DIAS APÓS-REPASTO SANGÜÍNEO	EM - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	PCR - Nº POSITIVOS/ TOTAL (%)	REPETIÇÃO PCR (TRIPLICATA) Nº POSITIVOS = SOMATÓRIA DAS AMPLIFICAÇÕES/ TOTAL (%)
10 / 30º	7/19 (36,8)	13/19 (68,4)	15/19 (78,9)
11 / 60º	7/19 (36,8)	11/19 (57,9)	13/19 (68,4)
Total de amostras	14/38 (36,8)	24/38 (63,2)	28/38 (73,7)

Figura 8 – Comparação da PCR com o EM em amostras procedentes do tubo digestório no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60 º dia após o repasto sangüíneo em camundongos infectados pelo *T. cruzi* e com baixa parasitemia

Quando comparadas a PCR com o EM em amostras procedentes do tubo digestório dos 216 triatomíneos infectados em camundongos com baixa parasitemia (Tabela 9), pode-se observar que houve concordância na detecção de amostras positivas, entre as duas técnicas, em 19% das amostras. A PCR foi positiva em contraponto ao EM que foi negativo em 40,3% das amostras; enquanto que em apenas 1,4% das amostras a PCR foi negativa e o EM positivo, e em 39,4% houve concordância, entre a PCR e o EM, sobre a negatividade das amostras.

Tabela 9 – Comparação da detecção da cepa Y de *T. cruzi* pela PCR e pelo EM em amostras procedentes do tubo digestório de 216 triatomíneos infectados em camundongos com baixa parasitemia

	PCR positiva	PCR negativa	Total
EM positivo	41 (19,0%)	3 (1,4%)	44
EM negativo	87 (40,3%)	85 (39,4%)	172
Total	128	88	216

8. DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

8.1 Amostras de material biológico obtido do trato digestório dos triatomíneos: definição da análise individual versus análise de “pool”

A opção pelo exame individual dos triatomíneos foi tomada com o intuito de avaliar em quantos insetos seria possível detectar a presença do *T. cruzi*, por uma técnica (PCR) em relação à outra (EM). Além disso, a análise individual das amostras favoreceria a definição de qual método seria mais sensível e detectaria a presença do parasita mais precocemente. No relato de Russomando et al. (1996) no qual os testes foram realizados em papel de filtro, os autores compararam a detecção por PCR e EM de triatomíneos infectados, em relação ao tempo, de acordo com análise individual de insetos. Diferentemente, Shikanai-Yasuda et al. (1996) ao compararem o EM com a PCR, escolheram analisar as amostras dos insetos em “pool”, mas neste caso, o que se pretendeu foi determinar qual técnica diagnosticava mais prontamente o paciente. Sendo assim, a análise das amostras oriundas do tubo digestório dos triatomíneos que foi realizada de forma individual no presente estudo,

permitiu que se determinasse que a PCR detecta mais casos positivos que o EM, tanto no modelo de alta parasitemia, quanto no de baixa parasitemia, em praticamente todos os tempos estudados (precoces, intermediários e tardios). No entanto, caso a PCR venha a ser preconizada como exame complementar ao xenodiagnóstico, e seja realizada da forma como foi feita neste estudo, isto é, acoplada ao EM, deve ser considerada a possibilidade de realização tanto do EM quanto da PCR em “pool” de amostras de insetos infectados com sangue de um dado paciente, com o intuito de favorecer a detecção do *T. cruzi*, notadamente em amostras pauci parasitárias. A análise do “pool” de amostras poderia, eventualmente, “concentrar” os parasitas, facilitando a detecção dos mesmos.

8.2 Extração de DNA para a PCR

A extração de DNA das amostras foi baseada em protocolo previamente utilizado por Kirchhoff e Donelson (1993), que consiste na fervura do material biológico e obtenção de DNA bruto. Este protocolo simplificado de extração de DNA permitiu o manuseio de muitas amostras simultaneamente, com rapidez, limitando a possibilidade de contaminação no estágio de extração do DNA. Também houve redução significativa de custos ao não se adicionar novos reagentes, que também poderiam atuar como inibidores da reação de amplificação.

Da mesma forma, Breniere et al. (1995) ao realizarem a extração do DNA das amostras do tubo digestório de triatomíneos, adicionaram 200 µl de água destilada, sendo a seguir realizada fervura e centrifugação. Segundo os autores, a falta de purificação do DNA pode ter feito com que a sensibilidade da PCR fosse de apenas 82% nas amostras do *T. infestans*. No entanto, utilizando o mesmo método de extração, a PCR foi capaz de identificar o *T. cruzi* em amostras não diagnosticadas pelo EM (4,6% para *T. infestans*, 19,1% para *E. mucronatus*, 12,5% para *T. sordida* e 52,3% para o *R. pictipes*). Ademais, a PCR detectou o *T. cruzi* em 3 espécies silváticas, o que não ocorreu com o EM.

No estudo de Dorn et al. (1999) os oligonucleotídeos iniciadores tiveram como alvo uma região conservada dos minicírculos do cinetoplasto. A extração de DNA consistiu na adição de 200 µl de água deionizada estéril às amostras procedentes dos triatomíneos, seguida de fervura e centrifugação. Como no presente estudo, Dorn et al. demonstraram que a PCR foi mais sensível que o EM. Mas, naquele estudo, a superioridade foi verificada apenas nas amostras procedentes do *Rhodnius prolixus*.

8.3 Extração de DNA para a PCR e inibidores da amplificação

Informações conflitantes sobre reagentes utilizados em extrações de DNA, como o fenol, estimularam, neste estudo, a opção pelo método de extração mais simples, sem introdução de possíveis substâncias inibidoras.

Segundo o estudo de Moser et al. (1989), DNA do *T. cruzi* foi prontamente detectado após extração com fenol-clorofórmio de conteúdo do tubo digestório de insetos infectados experimentalmente. Também no estudo de Russomando et al. (1996) a extração de DNA a partir de amostras do tubo digestório de triatomíneos foi realizada com proteinase K e fenol-clorofórmio, obtendo-se sensibilidade superior ao EM. Por outro lado, Araújo et al. (2002), ao realizarem a extração de DNA a partir de amostras sanguíneas de cães, afirmaram que a utilização de fenol e clorofórmio poderia inibir a ação da enzima Taq DNA polimerase, gerando resultados falsos-negativos.

Sabe-se que a Taq DNA polimerase é muito sensível à degradação proteolítica quando da utilização de detergentes em combinação com a proteinase K, utilizada para desnaturar e subseqüentemente digerir as proteínas presentes nos materiais biológicos. Além disso, o fenol também pode inibir diretamente a ação da DNA polimerase (Rolfs et al., 1992). Contudo, comparando-se dois métodos de extração, sendo o primeiro com proteinase K e fenol-clorofórmio, e o segundo apenas com água, a partir de fezes de triatomíneos, Shikanai-Yasuda et al. (1996) mostraram que pelo primeiro método houve aumento de sensibilidade da técnica de PCR. Dentre as amostras analisadas por PCR, 28% foram positivas quando o método de fervura foi empregado, enquanto 59% foram positivas quando a extração pelo fenol-clorofórmio foi utilizada.

No presente estudo, averiguou-se a possível existência de inibidores em todas as amostras, adicionando-se DNA de *T. cruzi*. Em todas elas houve

amplificação do fragmento de 144 pb, específico da sequência TCZ de *T. cruzi*, demonstrando-se ausência de inibidores, o que permitiu que fossem valorizados os resultados negativos obtidos por PCR.

Por outro lado, Breniere et al. (1995) afirmam que este lisado bruto obtido apenas com fervura e centrifugação pode conter vários inibidores. Alguns destes inibidores incluem produtos de degradação da hemoglobina, que podem variar em quantidade e qualidade, dependendo do sistema digestório de cada inseto. Dorn et al., em 1999 e 2001, relataram a presença de fatores de inibição das amplificações em amostras teciduais procedentes do estômago, reto e do intestino dos triatomíneos. Neste estudo as amostras retais foram as que apresentaram maior positividade, isto é, 45,7% (59/129), seguidas pelo intestino, 33,6% (41/122), e estômago, 20,3% (16/79). Contudo, 10,5% das infecções causadas pelo *Rhodnius* não teriam sido identificadas se apenas a amostra retal tivesse sido analisada. Devido à menor positividade por PCR de amostras do estômago e intestino, estes dois sítios anatômicos foram avaliados quanto à presença de inibidores da amplificação. Os vetores com amostras retais positivas, porém negativas no estômago e intestino foram identificados. Às amostras negativas foi adicionado DNA de *T. cruzi*, sendo as mesmas submetidas à nova amplificação. Cinco em 6 amostras do estômago não amplificaram quando o DNA exógeno foi adicionado. Contrariamente, 6 em 7 amostras intestinais amplificaram com a adição do DNA. Os resultados mostraram que o material procedente do estômago inibe a PCR, portanto, o estômago não seria uma boa fonte de material biológico para a amplificação.

Ademais, trabalhos que estimam a porcentagem de infecção por meio da análise de amostras deste tipo estão provavelmente subestimando os dados. No estudo de 2001, Dorn et al., afirmaram que a PCR não é inibida pelo sangue remanescente nas amostras, mas por algum outro componente presente no estômago do inseto. Como já afirmado anteriormente, no presente estudo não se observou inibição das amplificações, ainda que se tenha avaliado amostras procedentes do trato digestório como um todo, incluindo as amostras do estômago.

8.4 PCR: comparação do DNA nuclear com o cinetoplástico

Neste estudo foi escolhida a sequência repetitiva do DNA nuclear de *T. cruzi* chamada de TCZ, de 195 pb (Moser et al., 1989), como alvo da PCR, que amplificou um fragmento de 144 pares de base (Figura 4), ao invés dos minicírculos do cinetoplasto, os quais já haviam sido empregados em outros estudos sobre doença de Chagas (Degraeve et al., 1989). Esta escolha foi baseada em diversos fatores. Primeiramente, segundo Moser et al. (1989) embora os minicírculos e o elemento de 195 bp (TCZ) constituam aproximadamente a mesma fração do DNA total do parasita, a sequência do minicírculo de 1.450 pb possui apenas 4 cópias da região altamente conservada. Há também outra desvantagem para a região do minicírculo de 120 pb - já que ela apresenta alguma similaridade com o DNA do minicírculo de

outros tripanossomatídeos - é a reduzida especificidade na detecção (Moser et al., 1989). Além disso, os minicírculos estão firmemente “super-enrolados”, o que torna necessária a clivagem com enzimas de restrição para maximizar o acesso dos iniciadores e da Taq-DNA polimerase às seqüências alvo. Portanto, a abundância e a especificidade do elemento repetitivo de 195 bp (TCZ) tornam-no uma seqüência-alvo ideal para amplificação do DNA do *T. cruzi* (Moser et al., 1989).

8.5 PCR nas amostras negativas

Todas as amostras procedentes dos insetos alimentados em camundongos não infectados pelo *T. cruzi*, 110 ninfas de triatomíneos da 1ª fase, e 55 ninfas de triatomíneos da 2ª fase do estudo foram negativas tanto pelo EM como pela PCR, conforme esperado. Sendo assim, demonstra-se que não ocorreram falhas nas medidas para minimizar os riscos de contaminação ou inespecificidade do sistema de amplificação proposto, já que não foram observados resultados falso-positivos no presente estudo.

8.6 Teste de especificidade com os oligonucleotídeos iniciadores da seqüência TCZ do *T. cruzi*

Não ocorreu amplificação do DNA de amostras contendo *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* quando o par de oligonucleotídeos iniciadores do presente estudo foi utilizado para o teste de especificidade. Por outro lado, ao serem testados com amostras de *T. rangeli*, houve amplificação com concentrações de DNA variando de 1 µg até 10 ng, o que não ocorreu quando o DNA total das amostras foi diluído de 1 ng até 10 pg. No entanto, tendo em vista que a PCR utilizando este par de iniciadores é acoplada ao xenodiagnóstico e tem como objetivo a identificação de pacientes imunossuprimidos com reativação da doença de Chagas, as amplificações de DNA do *T. rangeli* não comprometem a aplicação desta PCR na prática clínica. Da mesma forma, no estudo de Lindoso, 1998, utilizando os iniciadores TCZ1 e TCZ2, verificou-se amplificação de DNA de duas cepas de *T. rangeli*, além da *L. mexicana* e *L. chagasi*. Por outro lado, vários autores, que também utilizaram os iniciadores TCZ1 e TCZ2, não observaram amplificação ao testarem DNA de *Leishmania* (Moser et al., 1989; Shikanai-Yasuda et al., 1996). Além disso, Shikanai-Yasuda et al. (1996) e Kirchhoff et al. (1996), utilizando o par de iniciadores TCZ1 e TCZ2, não obtiveram amplificação quando testaram amostras de DNA do *T. rangeli*. Estas contradições, ao ocorrerem reações inespecíficas com outros tripanossomatídeos, podem depender das condições

de amplificação, tais como concentração de DNA, temperatura de “annealing” durante os ciclos de amplificação, número de ciclos e até do tipo de termociclador.

8.7 Triplicata da PCR

Optou-se pela repetição da PCR em triplicata toda vez que o teste fosse negativo após a primeira amplificação, pelo fato da seqüência alvo de amplificação ser repetitiva, e as repetições ocorrerem em “tandem”, isto é, todas em um mesmo cromossomo e contíguas. Esta característica faz com que exista a possibilidade da ocorrência de fenômeno do tipo “tudo ou nada”, isto é, da seqüência TCZ estar presente na amostra, porém não ter sido incluída naquela alíquota que foi testada. De maneira lógica, testes em triplicata da mesma amostra de DNA poderiam minimizar este efeito. De acordo com a avaliação estatística utilizando-se o teste de McNemar, com intervalo de confiança de 95%, adotando-se nível de significância de $p < 0,05$, foi possível demonstrar que os resultados obtidos com a primeira PCR comparados àqueles após repetição do teste em triplicata foram discordantes, com significância estatística, indicando superioridade do teste após a realização da triplicata (Anexos H e I). Os testes que constam nos Anexos H e I demonstram que poderia ter sido adotado intervalo de confiança de 99%, com nível de significância de $p < 0,01$.

Araújo et al. (2002) relataram PCR positiva em 100% das amostras oriundas de nove cães infectados experimentalmente pelo *T. cruzi*, havia 5 a 12 anos, utilizando os iniciadores S35 e S36 oriundos da sequência dos minicírculos. Colheram no mínimo 2 amostras de sangue de cada animal, e realizaram até nove repetições da amplificação de cada amostra. A PCR no estudo de Russomando et al. (1996), que amplificou fragmento de 188 pb da sequência TCZ, foi realizada em duplicata.

8.8 Comparação do EM com a PCR (DNA cinetoplástico ou DNA nuclear)

Breniere et al. (1995) analisaram 345 amostras e utilizaram a região hipervariável dos minicírculos do DNA do cinetoplasto do *T. cruzi* como alvo da PCR. Os resultados obtidos foram comparados aos do EM. Os triatomíneos testados incluíram 4 espécies diferentes encontrados na Bolívia: *Triatoma infestans*, *Rhodnius pictipes*, *Eratyrus mucronatus* e o *Triatoma sordida*. Os diferentes espécimes foram capturados no campo em diferentes localidades. Para o *T. infestans*, principal vetor boliviano, as técnicas apresentaram concordância em 85,3% dos casos. O EM apresentou sensibilidade de 92,1% e a PCR de apenas 82,7%. Todas as amostras fecais colhidas do *R. pictipes*, *E. mucronatus* e *T. sordida* foram negativas pela observação microscópica e positivas pela PCR, revertendo os resultados obtidos com o *T. infestans*.

No presente estudo que teve como alvo o DNA nuclear de *T. cruzi*, a PCR apresentou superioridade duas a onze vezes maior que o EM para o *T. infestans*, dependendo do período após o repasto sanguíneo, no modelo de baixa parasitemia.

No estudo de Dorn et al. (1999), na Guatemala, a sensibilidade da PCR e do EM para o *T. cruzi*, nas amostras retais do *Triatoma dimidiata*, não apresentou diferenças significativas, sendo a sensibilidade da PCR de 39,1% e a do EM de 24,6%. Contudo, no *R. prolixus*, a PCR mostrou sensibilidade superior ao EM, 57,6% e 22,7%, respectivamente. A PCR foi realizada utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores para a região conservada do cinetoplasto dos minicírculos. Quando a análise englobou todas as amostras do estudo a PCR foi significativamente mais sensível que o EM: 65/135 e 32/135, respectivamente. No entanto, esta diferença foi atribuída à detecção no *R. prolixus*. Portanto, a PCR foi significativamente mais sensível que o EM para a detecção do *T. cruzi* no *R. prolixus*. Contudo, não houve diferença entre a PCR e o EM com relação à detecção do parasita no *T. dimidiata*.

No estudo de Russomando et al. (1996) a PCR, utilizando outros oligonucleotídeos iniciadores da sequência TCZ, foi empregada para detectar o DNA do *T. cruzi* em amostras fecais secas do *T. infestans* coletadas em papel de filtro. Ao avaliarem amostras procedentes de insetos coletados em área endêmica paraguaia, 84% delas foram positivas pela PCR seguida de hibridização ("Southern blotting"), enquanto apenas 26% foram positivas pelo EM.

Em estudo realizado por Shikanai-Yasuda et al. (1996), no Brasil, ninfas do *T. infestans* alimentadas em pacientes na fase crônica da doença, ao serem examinadas pela PCR e pelo EM, mostraram sensibilidade superior da primeira técnica. Foram analisados 54 pares de amostras, consistindo de 2 grupos de 10 insetos cada (um total de 1.080), no âmbito do xenodiagnóstico. Um grupo de 10 insetos em cada par foi analisado pela PCR e o outro grupo de 10 insetos, pelo EM. A PCR apresentou resultados positivos em 32 dos 54 grupos de insetos examinados (59%), enquanto apenas 7 (13%) foram positivos pelo EM.

Observa-se que estes dois últimos estudos empregaram oligonucleotídeos iniciadores oriundos da mesma seqüência repetitiva TCZ do DNA nuclear de *T. cruzi*, assim como no presente estudo. E tanto Russomando et al. (1996), quanto Shikanai-Yasuda et al. (1996) obtiveram sensibilidade superior da PCR em relação ao EM, o que foi confirmado em nosso estudo, em todos os tempos estudados, nos dois modelos (alta e baixa parasitemia), com a única exceção representada pelo 4º dia no grupo de alta parasitemia, no qual houve equivalência da positividade pelas duas técnicas. Contrariamente aos dois últimos autores e ao presente estudo, Breniere et al. (1995) e Dorn et al. (1999) utilizaram como alvo da amplificação o DNA mitocondrial do parasita. Nesses relatos a sensibilidade da PCR e do EM quase sempre se equivaleram no *T. infestans* e no *T. dimidiata*. A explicação pode estar relacionada ao protocolo de extração do DNA mitocondrial, que é mais complexo que o de DNA nuclear, como já explicado anteriormente.

Segundo Lindoso (1998) os oligonucleotídeos iniciadores TCZ1 e TCZ2, que amplificam sequência repetitiva de 188 bp do DNA genômico, reconhecem fragmentos de DNA parasitário mais freqüentemente entre os tripanossomatídeos quando comparados aos iniciadores S35 e S36, que amplificam sequência repetitiva de 330 pb do DNA do cinetoplasto. Também Espinoza-Gómez et al. (2002) utilizaram os iniciadores TCZ1 e TCZ2 em estudo epidemiológico que avaliou a presença de triatomíneos infectados e o risco de transmissão da doença de Chagas em Colimã, México. Os autores realizaram a PCR em 60 amostras de fezes que foram positivas pelo EM, sendo que em 52 (86,6%) houve detecção da espécie *T. cruzi*, de acordo com o método de Kirchhoff et al. (1996).

Machado et al. (2000), mostraram concordância entre o exame microscópico do *T. cruzi* e a PCR nas fezes coletadas em papel de filtro, até 60 dias após a infecção do *Dipetalogaster maximus*. A PCR foi realizada utilizando os iniciadores Diaz-7 e Diaz-8, que amplificam um fragmento de 195 pb, da sequência repetitiva TCZ do DNA nuclear.

8.9 Comparação da PCR com o EM na alta e na baixa parasitemia

Com relação à análise de sensibilidade dos dois testes empregados, isto é, da PCR e do EM, foi possível verificar que até mesmo no modelo de alta parasitemia, no qual seria lógico esperar porcentagem significativa das amostras positivas pelos dois métodos, o EM apresentou positividade inferior à PCR em todos os tempos analisados, com exceção do 4º dia, quando os resultados foram equivalentes (Figura 7). Na Tabela 6, que compara a PCR com o EM no modelo de baixa parasitemia, do 1º ao 5º dia, é possível verificar que a PCR apresentou positividade de quatro até onze vezes maior que o EM, sendo que somente a PCR foi positiva no 1º dia, detectando 40% dos casos (8/20). A detecção de maior número de amostras positivas pela PCR após o xenodiagnóstico, nos períodos iniciais após repasto sanguíneo, é fundamental notadamente no modelo de baixa parasitemia, uma vez que o mesmo se aproxima da situação vivenciada pelos pacientes imunossuprimidos com reativação da doença de Chagas.

Muito embora tenha sido demonstrada a superioridade da PCR em relação ao EM, utilizando-se avaliação estatística (teste de McNemar) com intervalo de confiança de 95%, adotando-se nível de significância de $p < 0,05$, os testes que constam nos Anexos J, K, L, M, N e O demonstram que poderia ter

sido adotado intervalo de confiança de 99%, com nível de significância de $p < 0,01$.

8.10 Concordância da PCR com o EM na alta e na baixa parasitemia. Vantagens e desvantagens da PCR e do EM.

No modelo de alta parasitemia, 38 (35,8%) amostras foram positivas pela PCR e negativas pelo EM, e apenas 2 (1,9%) amostras foram positivas pelo EM e negativas pela PCR (Tabela 5). No modelo de baixa parasitemia, das 216 amostras obtidas de triatomíneos infectados, 87 (40,3%) foram positivas pela PCR e negativas pelo EM, e apenas 3 (1,4%) foram positivas pelo EM e negativas pela PCR (Tabela 9). É provável que estes casos de EM positivo e PCR negativa tenham ocorrido porque naquela alíquota separada para a PCR não existisse DNA do parasita. No caso das 38 amostras da primeira fase, e nas 87 amostras da segunda fase, que foram positivas por PCR e negativas pelo EM, o parasita poderia não estar presente na alíquota separada ou estar morto, o que dificultaria a visualização no EM.

Shikanai-Yasuda et al. (1996) afirmaram que o EM dos excrementos dos insetos na pesquisa de parasitas móveis é cansativo e demorado, o que poderia explicar em parte a mais baixa sensibilidade do exame tradicional. Estas características constituem desvantagens do EM, impressão que é corroborada pelos resultados do presente estudo. Como também afirmou Kirchhoff et al.

(1996) e Shikanai-Yasuda et al. (1996) uma desvantagem adicional do EM é que a lâmina tem que ser examinada imediatamente, enquanto o sangue ainda encontra-se “fresco”, não podendo ser armazenada para realização horas ou dias mais tarde, enquanto que o processamento do sangue para a PCR pode ser postergado por vários dias, e interrompido em vários pontos do protocolo, sem causar, aparentemente, prejuízos ao resultado final. Por outro lado, sabe-se que, embora trabalhoso e subjetivo (depende da experiência do biólogo), o EM apresenta baixo custo, o que é indiscutivelmente vantajoso em nosso meio, e em outros países endêmicos com recursos financeiros limitados (Dorn et al., 1999).

8.11 Avaliação da realização da PCR de acordo com os tempos após o repasto sangüíneo: importância da precocidade da realização da PCR

Por ser o padrão adotado no xenodiagnóstico (Umezawa e Braz, 1997, Luquetti e Rassi, 2000) decidiu-se manter as leituras clássicas realizadas no 30^o e 60^o dia para o diagnóstico dos pacientes com doença crônica, e acrescentou-se os tempos intermediários 10^o, 15^o, 20^o e 25^o dia, devido à escassez de informações na literatura sobre a parasitemia neste período.

Em avaliação por meio do xenodiagnóstico em indivíduos na fase aguda da doença de Chagas, Romaña e Briones, em 1954, detectaram positividade, por meio do EM realizado no âmbito do xenodiagnóstico, em tempos mais precoces da infecção dos triatomíneos, iniciando a procura dos parasitas no 6^o dia após o repasto sangüíneo, até o 10^o dia. Estes achados, embora não tenham sido posteriormente confirmados em estudos complementares, serviram de estímulo ao delineamento do presente estudo. Iniciamos, portanto, a investigação por PCR e EM a partir do 1^o dia após alimentação dos triatomíneos em camundongos infectados. Muito embora a PCR e o EM tenham apresentado positividade significativa no modelo de alta parasitemia, o comportamento não foi o mesmo no modelo de baixa parasitemia. Na fase 2 do estudo, o exame microscópico só foi positivo a partir do 2^o dia (apenas 1 amostra positiva em 20), mesmo assim, com sensibilidade bastante reduzida em relação à PCR, o que também ocorreu no 3^o dia, e nos tempos subseqüentes (Tabela 6). Contrariamente, a PCR foi capaz de detectar presença de DNA parasitário, em elevado número de triatomíneos, desde o 1^o dia após o repasto sangüíneo (8/20); com 11/20 no 2^o dia, 8/20 no 3^o dia, 14/20 no 4^o dia e 12/19 no 5^o dia (Tabela 6). É fundamental enfatizar a importância da detecção de DNA parasitário em tempos precoces após o repasto sangüíneo neste modelo de baixa parasitemia, uma vez que poderíamos antecipar o diagnóstico em pacientes imunossuprimidos, podendo eventualmente, melhorar o prognóstico dos mesmos. Outro fato digno de nota foi a observação de que também o EM foi capaz de detectar triatomíneos em tempos precoces, em

número menor em relação à PCR, nos dois modelos estudados, porém esta detecção não foi nula, o que deverá estimular os centros com poucos recursos financeiros a realizarem leituras microscópicas em tempos precoces no âmbito do xenodiagnóstico.

Russomando et al. (1996) compararam a PCR realizada com amostras coletadas em papel de filtro e o EM, sendo capazes de detectar DNA parasitário em fezes do *Triatoma infestans* alimentados em 4 macacos *Cebus apella* experimentalmente infectados pela cepa Y, na fase crônica da doença, isto é, com baixa parasitemia. Em um dos macacos, a detecção foi possível a partir do 2º dia após alimentação dos insetos com sangue dos primatas. O resultado obtido mostrou que 5/15 e 9/15 triatomíneos, respectivamente, no 2º e 4º dia após alimentação, estavam positivos pela PCR realizada com amostras coletadas em papel de filtro. Em contrapartida, o EM foi positivo apenas no 16º dia. Estes autores sugerem que a PCR poderia antecipar o xenodiagnóstico convencional, o qual usualmente levaria 30 dias a partir da alimentação dos insetos. Além disso, observaram que parasitas mortos são amplificados pela PCR em amostras coletadas em papel de filtro, e que o EM não permite a visualização dos mesmos.

Como foi demonstrado no presente estudo, é possível detectar DNA do *T. cruzi* em material do tubo digestório do *T. infestans* já a partir do 1º dia após repasto sanguíneo, e também é possível afirmar que muitas formas do parasita presentes nas amostras poderiam estar mortas, e ainda assim serem

amplificadas pela PCR, valorizando-se ainda mais o teste molecular acoplado ao xenodiagnóstico.

O presente estudo demonstrou superioridade da PCR sobre o EM na avaliação do *T. infestans* infectado pela cepa Y do *T. cruzi*, nos dois modelos (alta e baixa parasitemia), em praticamente todos os tempos estudados, oferecendo novas perspectivas para que a confirmação diagnóstica seja feita de forma mais precoce e com maior sensibilidade em relação às leituras tradicionais do xenodiagnóstico. O modelo de baixa parasitemia pretendeu simular a parasitemia que ocorre nos episódios de reativação da doença de Chagas em pacientes imunossuprimidos, e o diagnóstico da reativação nos tempos precoces é de relevância clínica, uma vez que poderá influenciar o prognóstico destes pacientes. Sendo assim, a introdução de um teste mais sensível na rotina diagnóstica da doença de Chagas seria benéfica para este grupo de pacientes, mesmo que inicialmente a PCR fosse realizada como exame complementar ao xenodiagnóstico.

9. CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresenta vantagens quando comparada ao exame microscópico (EM) como exame complementar ao xenodiagnóstico, uma vez que:

9.1 A PCR foi superior ao EM, em 10 dos 11 tempos estudados no modelo de alta parasitemia, tendo apresentado positividade equivalente apenas no 4^o dia após repasto sanguíneo;

9.2 A PCR foi superior ao EM em todos os tempos estudados no modelo de baixa parasitemia. A PCR se mostrou particularmente importante neste modelo, sobretudo nos períodos iniciais após-repasto sanguíneo, o que permite a detecção precoce do DNA do *T. cruzi*. Este fato poderá favorecer o diagnóstico precoce da reativação da doença, beneficiando sobretudo, pacientes imunossuprimidos.

10. ANEXOS

ANEXO A

EXAME DIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DO *Trypanosoma cruzi* APÓS CONCENTRAÇÃO POR MICRO-HEMATÓCRITO E QUANTITATIVE BUFFY COAT (QBC)

(Umezawa E e Braz, LMA, 1997, Amato-Neto et al., 1996)

Pela técnica do micro-hematócrito, centrifuga-se aproximadamente 50 ml de sangue, em tubo capilar, a 3.500 rpm, por 5 minutos. Posteriormente, corta-se o tubo na altura do creme leucocitário e coloca-se aproximadamente 5 µl do creme em lâmina, cobre-se com lamínula e examina-se em microscópio óptico, aumento de 400X.

Pelo “Quantitative Buffy Coat” ou QBC (kit da Becton Dickinson), preenche-se um tubo, revestido internamente com anticoagulante e o corante vital laranja de acridina, com 60 µl de amostra sanguínea. O tubo é submetido à centrifugação a 12.000 rpm, por 5 minutos. O parasita, se presente, localiza-se no creme leucocitário, e poderá ser visualizado após coloração pelo corante

vital, laranja de acridina, no microscópio de fluorescência, aumento de 600X, por imersão.

ANEXO B

EXAME DIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DO *Trypanosoma cruzi* APÓS MULTIPLICAÇÃO EM MEIO LIT - HEMOCULTURA

(Umezawa E e Braz, LMA, 1997)

Pela hemocultura, amostras sangüíneas procedentes dos pacientes são cultivadas em meio LIT ("Liver Infusion Tryptose"). Este é uma infusão de fígado contendo triptose, hemina, soro fetal bovino, glicose, cloreto de sódio, cloreto de potássio e fosfato dissódico. Trinta mililitros de sangue são centrifugados a 3500 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Ressuspende-se o sedimento em meio LIT e centrifuga-se novamente a 3500 rpm, por 20 minutos, a 4°C. Adiciona-se 10 ml de LIT ao novo sedimento e distribui-se a mistura em 6 tubos contendo 4 ml de meio LIT. Mantêm-se as culturas a 28°C, homogenizadas suavemente, uma vez por semana. Alíquotas de 10 µl da suspensão de cada tubo, são examinadas em microscópio óptico, após 30 e 60 dias, entre lâmina e lamínula.

ANEXO C

TÉCNICAS SOROLÓGICAS PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS - HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA, IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ELISA (TÉCNICA IMUNOENZIMÁTICA) (Luquetti e Rassi, 2000)

A detecção de anticorpos anti-*T.cruzi* é o método de eleição para o diagnóstico etiológico da doença de Chagas na fase crônica. Pela hemaglutinação indireta, ao existirem anticorpos contra os antígenos que se encontram unidos à membrana das hemácias, formar-se-á uma aglutinação que se deposita suavemente, por gravidade, cobrindo de maneira uniforme o fundo de tubos ou os orifícios de placas de plástico. Se não houver anticorpos no soro testado, as hemácias sedimentam-se no fundo da cavidade formando um botão bem definido. Ambos os fenômenos são visíveis a olho nu.

Na imunofluorescência indireta o parasita é fixado em lâmina de microscopia e os anticorpos, se presentes no soro, reagem contra os epítomos do parasito fixado, após incubação. Para revelar a presença dos anticorpos, procede-se a uma segunda incubação, com anticorpos anti-IgG humana, conjugados com substâncias chamadas cromógenos, que, excitadas por luz

ultravioleta, emitem sinais de coloração verde, visíveis ao microscópio de fluorescência.

De princípio similar ao anterior, a reação imunoenzimática ou ELISA, em vez de conjugado com fluoresceína, utiliza anticorpo anti-IgG humana conjugado com uma enzima. Os anticorpos, se presentes, encontram-se solidamente unidos, por um lado, ao suporte sólido com o antígeno e, por outro, ao conjugado com a enzima. Ao adicionar o substrato apropriado e o cromógeno, a enzima acelera a transformação do cromógeno incolor para colorido. Essa cor, visível a olho nu ou passível de quantificação por espectrofotometria indica a presença de anticorpos anti-*T.cruzi*.

ANEXO D

Gene Bank – Resultados do “BLAST”

Trypanosoma rangeli (NCBI, 2005)

ANEXO E

Gene Bank – Resultados do “BLAST”

Leishmania amazonensis (NCBI, 2005)

ANEXO F

Gene Bank – Resultados do “BLAST”

Leishmania braziliensis (NCBI, 2005)

ANEXO G

Gene Bank – Resultados do “BLAST”

Leishmania chagasi (NCBI, 2005)

ANEXO H

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Teste de McNemar (Dorak, 2006)

**Grupo de ALTA PARASITEMIA – Comparação da PCR SIMPLES com a
PCR em TRIPLICATA – 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia**

ANEXO I

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Teste de McNemar ((Dorak, 2006)

**Grupo de BAIXA PARASITEMIA – Comparação da PCR SIMPLES com a
PCR em TRIPLICATA – 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia**

ANEXO J

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Teste de McNemar (Dorak, 2006)

Grupo de ALTA PARASITEMIA – Comparação do EM com a PCR – Tempos

PRECOCES (1º, 2º, 3º, 4º e 5º dia)

ANEXO K

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Teste de McNemar (Dorak, 2006)

**Grupo de ALTA PARASITEMIA – Comparação do EM com a PCR – Tempos
INTERMEDIÁRIOS (10º, 15º, 20º e 25º dia)**

ANEXO L

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Teste de McNemar (Dorak, 2006)

**Grupo de ALTA PARASITEMIA – Comparação do EM com a PCR – Tempos
TARDIOS (30º e 60º dia)**

ANEXO M

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Teste de McNemar (Dorak, 2006)

**Grupo de BAIXA PARASITEMIA – Comparação do EM com a PCR –
Tempos PRECOCES (1º, 2º, 3º, 4º e 5º dia)**

ANEXO N

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Teste de McNemar (Dorak,2006)

**Grupo de BAIXA PARASITEMIA – Comparação do EM com a PCR –
Tempos INTERMEDIÁRIOS (10º, 15º, 20º e 25º dia)**

ANEXO O

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Teste de McNemar (Dorak, 2006)

Grupo de BAIXA PARASITEMIA – Comparação do EM com a PCR –

Tempos TARDIOS (30º e 60º dia)

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Amato-Neto V, Matsubara L, Lanura PN. Avaliação do sistema quantitativo buffy coat (QBC) no diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: estudo em modelo experimental murino. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1996; 29: 59-61.

Andrade SG. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1985; 18: 39-46.

Apt W, Arribada A, Zulantay I, Solari A, Danchez G, Mundaca K, Coronado X, Rodríguez J, Gil LC, Osuna A. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005; 99: 733-41.

Araújo FMG, Bahia MT, Magalhães, NM, Martins-Filho OA, Veloso VM, Carneiro CM, Tafuri WL, Lana M. Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Tropica*. 2002; 81: 21-31.

Araújo-Jorge TC. Camundongo. In: Araújo-Jorge TC, Castro SL. *Doença de Chagas - Manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2000. p.134 -40.

Ávila HA, Pereira JB, Thiemann O, Paiva E, Degraive W, Morel CM, Simpson L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 2421-26.

Bar ME, Damborsky MP, Oscherov EB, Milano AMF, Avalos G, Wisnivesky-Colli C. Triatomines involved in domestic and wild *Trypanosoma cruzi* transmission in Concepción, Corrientes, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97: 43-46.

Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J, Carrasco R, Vargas F, Yarsic N, Noireau F. Field application of Polymerase Chain Reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in bolivian triatomines. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53: 179-184.

Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JE, Morel CM, Wincker P. *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of

kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol.* 1995a; 81: 462-471.

Britto C, Cardoso MA, Monteiro Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pirmez C, Morel CM e Wincker P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 1995b; 110: 241-47.

Brito C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macedo V, Fernandes O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96:823-826.

Carvalho CM, Andrade MC, Xavier SS, Mangia RH, Britto CC, Jansen AM, Fernandes O, Lannes-Vieira J, Bonecini-Almeida MG. Chronic Chagas' disease in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): evaluation of parasitemia, serology, eletrocardiography, echocardiography, and radiology. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68: 683-91.

Castro SL, Araújo-Jorge TC, Rivera MT, Junqueira ACV. Planejamento de experimentos e escolha dos modelos. Avaliação de parâmetros parasitológicos e de mortalidade. In: Araújo-Jorge TC & Castro SL. *Doença de Chagas - Manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2000. p.219-236

Chieffi PP, Amato Neto V. *Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do Trypanosoma cruzi*. In: Reunião sobre prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2000. p. 9-31.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal [Citado 20 Abr 2006]
Disponível em <http://www.meusite.com.br/COBEA/>

Coura JR, Borges-Pereira J, Alves Filho FI, Castro JAF, Cunha RV, Costa W, Junqueira ACV. Morbidade da doença de Chagas em áreas do sertão da Paraíba e da caatinga do Piauí. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996; 29: 197-205

Coura JR. A doença de Chagas humana e seus modelos de estudo. In: Araújo-Jorge TC & Castro SL. *Doença de Chagas - Manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2000. p.19-24.

Coura JR. Tripanosomose, Doença de Chagas. Ciência e Cultura. *Rev Soc Bras Prog Ciência*. 2003; 55: 30-33.

Degrave W, Fragoso SP, Britto C, Heurvrswyn H, Kidane GZ, Cardoso AB, Mueller U, Simpson L, Morel CM. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1988; 27:63-70.

Dias JCP. Prevenção secundária em doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34 (Supl.III): 24-36.

Dorak MT. *Common concepts in statistics*. [Cited 2006 Apr 12] Available from: <http://dorakmt.tripod.com/mtd/glosstat.html>

Dorn PL, Engelke D, Rodas A, Rosales R, Melgar S, Brahney B, Flores J, Monroy C. Utility of the Polymerase Chain Reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60: 740-745.

Dorn PL, Flores J, Brahney B, Gutierrez A, Rosales R, Rodas A, Monroy CI. Comparison of Polymerase Chain Reaction on fresh tissue samples and fecal drops on filter paper for detection of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96: 503-505.

Espinoza-Gómez F, Maldonado-Rodríguez A, Coll-Cárdenas R, Hernández-Suárez CM, Fernández-Salas I. Presence of triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and risk of transmission of Chagas disease in Colima, México. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: 25-30.

Fernandes O, Campbell DA. *Trypanosoma cruzi*: cepas de eleição. In: Araújo-Jorge TC & Castro SL. *Doença de Chagas - Manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2000. p.178-181.

Galvão LMC, Nunes RMB, Cançado JR, Krettli AU. Lytic antibody as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993; 87: 220-223.

Garcia ES e Azambuja P. Fisiologia de triatomíneos: Desenvolvimento, reprodução e interação com *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M, editores. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. p. 41-47.

Kalil J, Bocchi EA, Cunha-Neto E. Transplante cardíaco para tratamento da miocardiopatia chagásica. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M, editores. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. p. 416-423.

Kirchhoff LV, Donelson JR. PCR detection of *Trypanosoma cruzi*, African Trypanosomes, and *Leishmania* species. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. *Diagnostic molecular microbiology. Principles and Applications*. Washington DC; 1993. p. 443-55.

Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 1171-75.

Lazdins-Helds JK. Situational analysis and proposal to promote discovery and development of products for the treatment of individuals infected with *T. cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001; 34(suplIII):19-20.

Lindoso AABP. *Reação da polimerase em cadeia na doença de Chagas crônica: emprego de dois pares de iniciadores TCZ1/TCZ2 e S35/S36 em isolados de Trypanosoma cruzi de sangue de pacientes e em outros tripanosomatídeos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.

Luquetti AO e Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* In: Brener Z, Andrade ZA e Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 344-379.

Machado EMM, Alvarenga NJ, Romanha AJ, Grisard EC. A simplified method for sample collection and DNA isolation for Polymerase Chain Reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 863-866.

Maldonado C, Albano S, Vettorazzi L, Salomone O, Zlocowski JC, Abiega C, Amuchastegui M, Córdoba R, Alvarellos T. Using polymerase chain reaction in early diagnosis of reactivated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2004; 23: 1345-8.

Martins LPA, Castanho REP, Rosa JA, Silva LC, Godoy CAP, Rosa RM. Caracterização biológica, histopatológica e análise de ácido nucléico de uma cepa *Trypanosoma cruzi* da região de Marília, SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36: 35-39.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 1477-1482.

NCBI. National Library of Medicine. *Gene Bank*. [cited 2005 Nov. 27] Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

Nisida IVV *Avaliação da transmissão da doença de Chagas congênita em três Instituições da cidade de São Paulo*. [dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.

Pessoa SB e Martins AV. *Pessoa Parasitologia Médica*. 11^a ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 1985 p.142.

Portela-Lindoso AA, Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saúde Pub.* 2003; 37: 107-15.

Raiz Jr. R, Diogo C, Okay TS. Otimização de uma Reação em Cadeia da Polimerase para a detecção do DNA do *Trypanosoma cruzi* com o uso de co-solventes e adjuvantes em amostras de sangue total. *News Lab.* 2001; 45:110-114.

Rey L. *Rey Parasitologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991 p.134.

Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I. *PCR: clinical diagnostics and research*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1992.

Romaña C, Briones S. El xenodiagnóstico como metodo para diagnosticar casos agudos de enfermedad de Chagas. *Ann Inst Med Reg.* 1954; 4: 35-41.

Russomando G, Arias AR, Almiron M, Figueiredo A, Ferreira ME, Morita K. *Trypanosoma cruzi*: Polymerase chain reaction-based in dried feces of *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol.* 1996; 83: 62-66.

Salomone OA, Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Reyes ME, Omelianuk M, Fernandez RA, Enders J, Palma A, Barral JM, Madoery RJ. *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease, Argentina. *Emerg Inf Dis*. 2003; 9: 1558-62.

Santos-Mallet JR. Vetores da doença de Chagas e sua relação com o hospedeiro vertebrado e o parasita. In: Araújo-Jorge TC e Castro SL. *Doença de Chagas. Manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2000. p. 25-31.

Schijman AG, Vigliano C, Burgos J, Favaloro R, Perrone S, Laguens R, Levin MJ. Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *J Heart Lung Transpl*. 2000; 19: 1114-17.

Sherlock IA. Vetores. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M, editores. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. p. 21-40.

Shikanai-Yasuda MA, Ochs DE, Tolezano JE, Kirchhoff LV. Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1996; 90: 649-651.

Silber AM, Bua J, Porcel BM, Segura EL, Ruiz AM. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp Parasitol*. 1997; 85: 225-32.

Silveira AC, Vinhaes M. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31(II): 15-60.

Silveira AC. Old and new challenges facing the control of Chagas' disease in the Américas. *Rev Inst Med Trop S.Paulo*. 2003; 45: 31-32.

Steindel M, Dias JCP, Romanha AJ. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. *Ciência Hoje*. 2005; 37: 32-38.

Stolf NAG, Higuchi L, Bocchi EA, Bellotti G, Auler JO, Uip D, Amato Neto V, Pileggi F, Jatene AD. Heart transplantation in patients with Chagas' disease cardiomyopathy. *J Heart Transplant.*, 1987; 6: 307-12.

Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper Jr N et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:2134-47.

Umezawa ES, Braz LMA. *Diagnóstico da doença de Chagas*. In: Amato-Neto V. Curso de Diagnóstico da doença de Chagas. Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 1997. p. 3-27.

Vera-Cruz JM, Magallón-Gastelum E, Grijalva G, Rincón AR, Ramos-Garcia C, Armendáriz-Borunda J. Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitol Res*. 2003; 89: 480-86.

Verlengia R, Hirata RDC, Hirata MH. Prevenção e controle de contaminação nas reações de amplificação de ácidos nucleicos. *News Lab*. 2000; 43: 69-43.

Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68: 574-82.

Wendel S. *Risco residual da transmissão da infecção por Trypanosoma cruzi por via transfusional no Brasil* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

World Health Organization. Control of Chagas disease: Report of WHO expert committee. *World Health Organization Technical Report Service*. 1991;811: 1-42.

*De acordo com:

Adaptado de *International Committe of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.