



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JULIANA DE JESUS GUIMARÃES FERREIRA

QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DO *Trypanosoma cruzi* PELA PCR EM
TEMPO REAL EM PORTADORES DA DOENÇA DE CHAGAS SUBMETIDOS AO
TRANSPLANTE RENAL ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNICAMP

CAMPINAS

2018

JULIANA DE JESUS GUIMARÃES FERREIRA

QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DO *Trypanosoma cruzi* PELA PCR EM
TEMPO REAL EM PORTADORES DA DOENÇA DE CHAGAS SUBMETIDOS AO
TRANSPLANTE RENAL ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNICAMP

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Mestra em Ciências, na área de concentração
Clínica Médica.

ORIENTADOR: Eros Antonio de Almeida

CO-ORIENTADOR: Sandra Cecília Botelho Costa

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Juliana de Jesus
Guimarães Ferreira e orientada pelo Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

F413q Ferreira, Juliana de Jesus Guimarães, 1989-
Quantificação da carga parasitária do *Trypanosoma cruzi* pela PCR em tempo real em portadores da doença de Chagas submetidos ao transplante renal atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp / Juliana de Jesus Guimarães Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Eros Antonio de Almeida.
Coorientador: Sandra Cecília Botelho Costa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Chagas. 2. PCR em tempo real. 3. Hemocultura. 4. Transplante renal. I. Almeida, Eros Antonio de, 1951-. II. Costa, Sandra Cecília Botelho. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Quantification of parasite load of *Trypanosoma cruzi* by real-time PCR in carriers of Chagas disease submitted to kidney transplantation attended on the Clinical Hospital of Unicamp

Palavras-chave em inglês:

Chagas disease

Real-time PCR

Blood culture

Kidney transplantation

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Eros Antonio de Almeida [Orientador]

Maria Elena Guariento

Cleide Marques Ferreira

Data de defesa: 16-01-2018

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

JULIANA DE JESUS GUIMARÃES FERREIRA

ORIENTADOR: Eros Antonio de Almeida

COORIENTADOR: Sandra Cecília Botelho Costa

MEMBROS:

1. PROF. DR. Eros Antonio de Almeida

2. PROF. DR. Maria Elena Guariento

3. PROF. DR. Cleide Marques Ferreira

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA [16/01/2018]

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.*

- Madre Teresa de Calcutá

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar forças para correr atrás dos meus sonhos;

À Unicamp, pela oportunidade e também por ceder bolsa-auxílio, através da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), para que eu pudesse me dedicar em tempo integral a este trabalho;

À Dra Sandra Costa, que abriu as portas do seu laboratório para mim, desde a época que eu era estagiária, e também por ser minha co-orientadora neste trabalho;

Ao Dr Eros de Almeida, por me orientar, dividir seus tenros conhecimentos sobre doença de Chagas e pela paciência;

Aos pacientes que aceitaram participar desta pesquisa, sem eles não seria possível sua realização;

À secretária Irene e todo o pessoal da enfermagem do HC e da Nefrologia pela ajuda com a coleta de sangue dos pacientes;

À Gláucia Marcon, por toda ajuda dada, por dividir suas experiências de pesquisa na FIOCRUZ/MS, pela parceria no grupo de pesquisa e pela amizade;

Ao técnico do laboratório Rodrigo, por executar com tanto empenho suas funções e além delas, agradeço imensamente pela ajuda com a técnica de PCR em tempo real, e também pela amizade;

Aos colegas de laboratório: Paula, Mariane, Tycha Bianca, Mariana, Angélica, Camila, Fernanda, Josiele, Jéssica, Emanuel, Renata, Jamile, Aglécio, Ana Carolina, alguns já seguiram seus caminhos, mas todos contribuíram de alguma forma com todo aprendizado adquirido até aqui, agradeço o carinho e amizade, e desejo muita luz no caminho de todos;

Às amigas: Marina, Michele, Thamires, Amanda, Aline por compartilharem um pouco de suas histórias comigo e estarem sempre presente nas minhas conquistas;

Aos meus pais, Ivone e Evaristo, por me presentear com o dom da vida e pelo apoio incondicional;

Às minhas irmãs, Tatiane e Mariana, por estarem comigo nos momentos difíceis e nos momentos alegres, sempre torcendo por mim e me incentivando;

Aos meus sobrinhos, Itallo e Fabrizio, por nos lembrar das delícias de ser criança e dar imensas alegrias à nossa família;

À todos, muito obrigada!!!!

Resumo

A reativação da doença de Chagas ocorre principalmente em indivíduos transplantados e portadores do vírus HIV, levando a quadros de lesões cutâneas, sintomas cardíacos e envolvimento do sistema nervoso central. Dados da literatura revelam que a instituição do tratamento com benznidazol é eficaz para controlar a reativação. É possível, também, que os medicamentos imunossupressores utilizados estejam relacionados com a reativação. O diagnóstico da reativação, na qual é possível verificar grande quantidade de parasitos intracelulares e circulantes, é baseado em métodos parasitológicos diretos como exame de sangue a fresco, gota espessa, esfregaço corado e métodos de concentração: microhematócrito, Strout e *buffy coat*. Técnicas moleculares, como a PCR convencional ou PCR em tempo real (qPCR) apresentam maior sensibilidade, pois detectam o DNA do parasito, mesmo que este esteja presente em pequena quantidade, o que poderia diagnosticar precocemente a reativação da doença de Chagas. Neste estudo, utilizou-se a hemocultura e a qPCR para analisar a carga parasitária de nove pacientes que foram submetidos ao transplante renal e seguidos no Hospital de Clínicas da Unicamp (grupo A). Foi avaliada também a carga parasitária de 15 pacientes chagásicos crônicos, não transplantados e não tratados para a doença de Chagas (grupo B). Não houve positividade da hemocultura no grupo de pacientes transplantados, e no grupo controle houve quatro casos positivos (26%). Na qPCR, houve dois casos negativos e sete casos de positividade abaixo do limite de quantificação no grupo dos pacientes transplantados. No grupo de pacientes não transplantados (B), de 15 amostras, três foram quantificadas em 0,1 parasito/ml, enquanto 12 apresentaram positividade abaixo do limite de quantificação da técnica. A hemocultura e a qPCR foram concordantes em quatro casos, mesmo que tenham apresentado carga parasitária abaixo do limite de quantificação pela qPCR. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas técnicas ($p < 0,05$). Dos pacientes transplantados, seis foram tratados para a doença de Chagas, o que pode explicar a baixa carga parasitária encontrada nesse grupo de pacientes e, dessa forma, não foi possível correlacionar a carga parasitária com o tempo de transplante e com o medicamento imunossupressor utilizado. Conclui-se que a qPCR é útil na monitorização da parasitemia em pacientes transplantados renais.

Palavras chave: Doença de Chagas. PCR em tempo real. Hemocultura. Transplante renal.

Abstract

The Chagas disease reactivation affects primarily transplanted subjects and carriers of HIV virus, leading to conditions of cutaneous lesions, cardiac symptoms and central nervous system involvement. Literature data expose which the treatment with benznidazole is effective to control the reactivation. It is possible which the immunosuppressive drugs used be related with reactivation. The diagnosis of reactivation, in which is possible find high amount of intracellular and circulating parasites, is based in direct parasitological methods as a fresh blood test, smeared smear and concentration methods: microhematocrit, Strout and *buffy coat*. Molecular techniques, as a conventional PCR or quantitative PCR (qPCR) presents greater sensitivity, because detect the parasite DNA, even which is present in low amount, which could diagnose the early the reactivation of Chagas disease. In this study, was utilized the blood culture and the qPCR to analyze the parasite load of nine patients that was submitted to kidney transplantation in the Clinical Hospital of Unicamp (group A). It was also analyzed the parasite load of 15 chagasic patients, not transplanted and not treated for Chagas disease (group B). There was no positivity of blood culture in the group of transplanted patients, and, in the group of not transplanted patients (group B), there were four positive results (26%). In the qPCR technique, there were two negative cases and seven cases below the limit of quantification in the group of transplanted patients. In the group of not transplanted patients (group B), of 15 samples, three were quantified in 0,1 parasite/ml, while 12 were positive below to limit of quantification oh technique. The blood culture and qPCR were concordant in four cases, even that presented parasite load below of limit of quantification by qPCR. There no was statistically significant difference between the two techniques ($p < 0,05$). Of transplanted patients, six were treated for Chagas disease, which could explain the low parasite load found in this group of patients and, thus, it was no possible to correlate the parasite load with the time of transplant or the immunosuppressive drug utilized. It is concluded that the qPCR is useful in the monitoring of parasitaemia in kidney transplant patients.

Keywords: Chagas disease. Real time PCR. Blood culture. Kidney transplant.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Representação do minicírculo do kDNA do <i>T. cruzi</i> . Fonte: Sturm <i>et al</i> (15)	15
Figura 2: Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> . A: Tripomastigota sanguíneo; B: Amastigota; C: Tripomastigota metacíclico; D: Epimastigota. Fonte: FIOCRUZ (17)	16
Figura 3: Espécies de triatomíneos: A: <i>Triatoma infestans</i> , B: <i>Rhodnius Neglectus</i> , C: <i>Panstrongylus megistus</i> . Fonte: Jurberg <i>et al</i> , 2014 (23)	17
Figura 4: Ciclo da doença de Chagas. Fonte: CDC (25)	18
Figura 5: Formas tripomastigotas sanguíneas do <i>T. cruzi</i> , corado pelo método Giemsa. Fonte: Abegg <i>et al</i> (57)	22
Figura 6: Formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> em repique de hemocultura positiva.	41
Figura 7: Reta da curva padrão, apresentando linearidade entre os pontos 10^5 à 10^{-1}	43
Figura 8: Representação gráfica da curva padrão da PCR em tempo real.	43
Figura 9: Exemplo de duas amostras com a quantificação abaixo do limite de quantificação	45

Lista de Tabelas

Tabela 1: Perfil dos pacientes do grupo A.	37
Tabela 2: Características do transplante de cada paciente	38
Tabela 3: Perfil dos pacientes do grupo B.....	40
Tabela 4: Resultados da hemocultura para o <i>T.cruzi</i> por grupo.....	40
Tabela 5: Concentração e absorbância obtidas na extração de DNA dos pacientes do grupo A.	41
Tabela 6: Concentração e absorbância obtidas na extração de DNA dos pacientes do grupo B.....	42
Tabela 7: Quantificação das amostras de pacientes do grupo A, obtidas pela técnica de qPCR.....	44
Tabela 8: Quantificação das amostras de pacientes do grupo B, obtidas pela técnica de qPCR.....	45
Tabela 9: Resultados das técnicas de sorologia, hemocultura e qPCR, e o tratamento para DC dos pacientes do grupo A.....	47
Tabela 10: Resultados das técnicas de sorologia, hemocultura e qPCR, e o tratamento para DC dos pacientes do grupo B.	47
Tabela 11: Análise estatística da diferença de gênero entre os grupos A e B pelo teste exato de Fischer.	48
Tabela 12: Análise estatística da diferença dos resultados de hemocultura entre os grupos A e B pelo teste exato de Fischer.	49
Tabela 13: Análise comparativa entre idade e quantificação pela qPCR pelo teste de Mann-Whitney.	49
Tabela 14: Análise comparativa entre hemocultura e qPCR pelo teste de Mann-Whitney	49

Lista de Abreviaturas

ABTO	Associação Brasileira de transplante de órgãos
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ATG	Globulina anti-timocítica
BZ	Benznidazol
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença renal crônica
DTU	<i>Discrete typing unit</i>
EDTA	Ácido etileno diamino-tetracético
Elisa	Enzyme-Linked immunosorbent assay
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
g	Força centrífuga relativa
GEDoCh	Grupo de Estudos em Doença de Chagas
GNC	Glomerulonefrite crônica
HA	Hemaglutinação
HC	Hospital de clínicas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IRC	Insuficiência renal crônica
Kb	Kilobases
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto

LIT	Liver Infusion Tryptose
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NF	Nifurtimox
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NTC	<i>No template control</i>
OKT-3	Anticorpo monoclonal anti-CD3
PCR	Reação em cadeia da polimerase
QBC	<i>Quantitative buffy coat</i>
QLM	Quimioluminescência
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SAME	Serviço de arquivo médico e estatístico
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SNT	Sistema nacional de transplantes
μl	Microlitro
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UNG	uracil N-glycosylase

Sumário

1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	30
3. Casuística e Métodos.....	31
4. Resultados.....	36
5. Discussão.....	50
6. Conclusões.....	56
7. Referências Bibliográficas.....	57
8. Anexos.....	70

1. Introdução

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanosomíase sul americana, foi descoberta em 1909, quando Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas descobriu concomitantemente o agente causador, o vetor e os sintomas clínicos da doença em Lassance, Minas Gerais/Brasil. Chagas relacionou a presença de insetos denominados “barbeiros” no interior de casas em áreas rurais, com o fato de que os habitantes que conviviam com os “barbeiros” apresentavam sintomas similares, e dessa forma conseguiu esclarecer o ciclo do parasito *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (1,2).

A doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada, endêmica em 21 países das Américas. É relacionada diretamente com o padrão socioeconômico e às condições precárias de moradia. Afeta aproximadamente seis milhões de pessoas, com uma incidência anual de 30.000 casos, 14.000 mortes/ano e 70 milhões de pessoas em risco de adquirir a doença (3). Nesses países, os parâmetros epidemiológicos na década de 90 apresentavam índices maiores, com 45.000 mortes/ano, 30 milhões de casos, incidência anual de 700.000 casos, 100 milhões de pessoas em risco de adquirir a doença (4). Dados do Ministério da Saúde (2015) (5) revelam que, no período de 2000 a 2013, foram notificados 1.570 registros de casos agudos da doença de Chagas no Brasil, sendo que 1.081 casos foram transmitidos pela via oral e, destes, 1.023 foram registrados na região norte do país (5).

O declínio nos casos da DC só foi possível devido à implantação de programas governamentais para controle da transmissão vetorial nos países que compõem o Cone Sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) iniciado em 1991; a Iniciativa dos Países Andinos (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela), em 1997; a Iniciativa dos Países da América Central (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá), em 1997; a Iniciativa dos Países Amazônicos (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela), em 2004 (6).

O surgimento da DC em países não endêmicos tem sido relatado desde o início da década de 1980, devido à migração populacional das Américas do Sul e Central para América do Norte, Europa e para a região do Pacífico Ocidental, transmitindo a DC por mecanismos não vetoriais. A migração de pessoas de áreas rurais para áreas urbanas também contribuiu para esse advento (7).

No Brasil, apesar de muitos Estados apresentarem a transmissão vetorial controlada (8), o Estado do Amazonas ainda apresenta índices de transmissão vetorial por vetores

peridomiciliares (9), e transmissão oral através do consumo de açaí e outros alimentos contaminados com o *T. cruzi* (10). De um modo geral, fatores como a domiciliação de novos vetores, focos residuais e naturais de triatomíneos, desenvolvimento de resistência a inseticidas, promoção de práticas de higiene para prevenir a transmissão oral, melhor gerenciamento do peridomicílio, aumento do rastreio pré-natal para prevenir a transmissão congênita e diminuição de interesses políticos na doença ainda podem representar desafios para o maior controle da DC no país (11).

1.1. Agente etiológico e transmissão da doença de Chagas

O agente etiológico da DC é o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Assim como os outros membros dessa ordem, possui uma organela denominada cinetoplasto, onde se encontra uma condensação de DNA extra-nuclear (kDNA), constituído por moléculas organizadas em forma de maxicírculos e minicírculos, podendo representar até 30% do DNA total do parasito (12). Cada minicírculo possui aproximadamente 1,4 Kb, com quatro regiões conservadas de 128 pares de bases, situadas em intervalos de 90°, que podem estar relacionadas na replicação dessas moléculas (Figura 1). O kDNA tem sido utilizado como ferramenta de detecção do *T. cruzi* através de técnicas de biologia molecular, devido ao seu caráter espécie-específico (13,14).

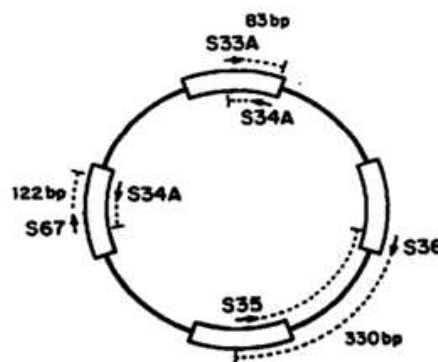


FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO DO MINICÍRCULO DO kDNA DO *T. CRUZI*. FONTE: STURM ET AL (15)

O *T. cruzi* apresenta diferentes formas evolutivas que variam entre hospedeiro vertebrado e invertebrado, e se diferenciam morfologicamente pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo celular e pela origem do flagelo. A forma amastigota é intracelular, encontrada no tecido do hospedeiro vertebrado, não possui membrana ondulante e flagelo, e se multiplica por fissão binária a cada 12 horas. A forma epimastigota é encontrada no trato digestivo de insetos triatomíneos, apresenta flagelo livre, cinetoplasto anterior ao núcleo, membrana ondulante pouco desenvolvida, é bastante móvel e possui intensa atividade replicativa. A forma tripomastigota metacíclica é encontrada na porção final do intestino do vetor, e a forma tripomastigota sanguínea é encontrada no sangue do hospedeiro vertebrado. Ambas as formas tripomastigotas são infectantes e não possuem caráter replicativo (Figura 2) (16).

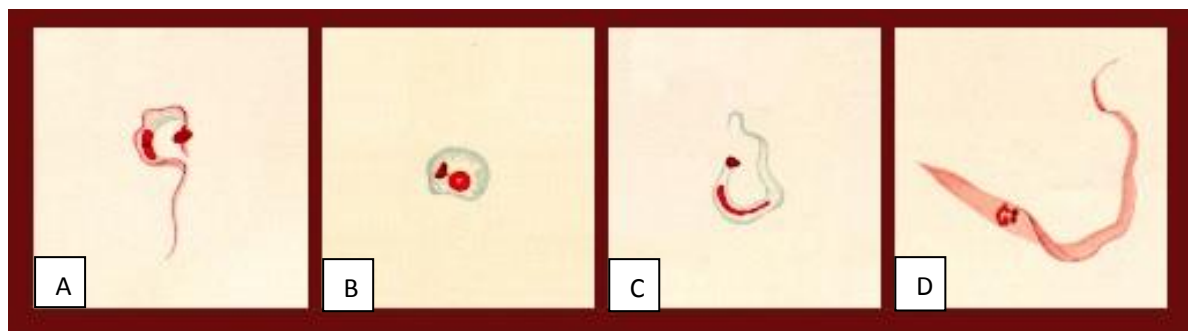


FIGURA 2: FORMAS EVOLUTIVAS DO *T. CRUZI*. A: TRIPOMASTIGOTA SANGUÍNEO; B: AMASTIGOTA; C: TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO; D: EPIMASTIGOTA. FONTE: FIOCRUZ (17)

A diversidade de interações do *T. cruzi* com seus hospedeiros invertebrados e vertebrados pode ter ocasionado a seleção, ampliação e adaptação de cepas com maior ou menor impacto na infecção humana (18).

A variabilidade genética do *T. cruzi* vem sendo estudada há anos, e a mais recente classificação foi introduzida por um consenso realizado entre especialistas (19), no qual o *T. cruzi* foi subdividido em seis unidades de tipagem (*Discrete Typing Units* – DTUs), que, de acordo com Tibayrenc (1998) (20), são sequências mais diretamente relacionadas entre si do que com qualquer outra, e podem ser identificadas através de marcadores moleculares ou imunológicos. A classificação do parasito em seis DTUs (TcI-TcVI) objetivou diferenciá-los com base em aspectos moleculares, eco-epidemiológicos e de patogenicidade (21).

A transmissão clássica da DC é por via vetorial, por meio de um ciclo complexo que envolve hospedeiros vertebrados. Os vetores que transmitem o parasito da DC compreendem insetos da família Reduviidae, que são encontrados em ambientes silvestres, peridomiciliares ou domiciliares rurais. Os principais gêneros envolvidos nesse ciclo são *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Figura 3) (22).

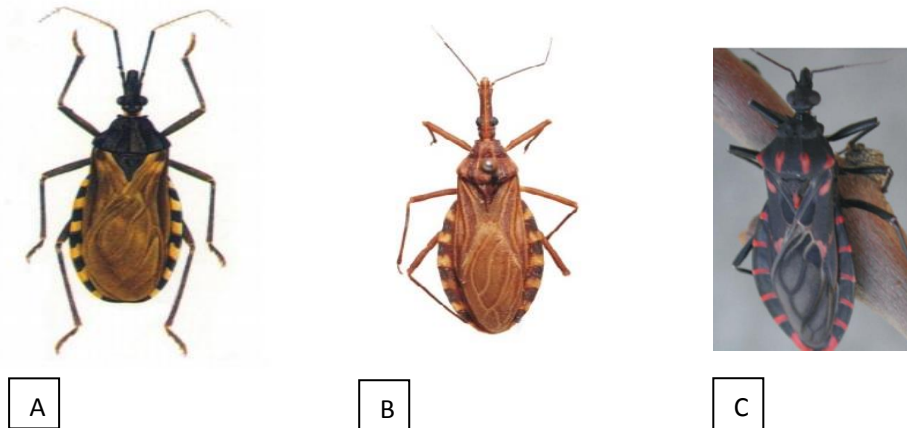


FIGURA 3: ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS: A: *TRITOMA INFESTANS*, B: *RHODNIUS NEGLECTUS*, C: *PANSTRONGYLUS MEGISTUS*. FONTE: JURBERG ET AL, 2014 (23)

Primordialmente restrito a mamíferos de pequeno porte como marsupiais, tatus, preguiças, tamanduás, roedores, primatas, quatis e morcegos, o ciclo se estendeu aos seres humanos com a sua entrada nos ecótopos naturais, tornando a DC uma antroponose (24).

Insetos triatomíneos contaminados com as formas infectantes do *T. cruzi* o transmitem ao defecarem na pele do hospedeiro após o repasto sanguíneo. A lesão causada pela picada é a porta de entrada do parasito na corrente sanguínea, iniciando o ciclo no hospedeiro vertebrado. O contato direto com fezes do triatomíneo na mucosa ocular também pode iniciar a infecção, constituindo o sinal de Romana (18).

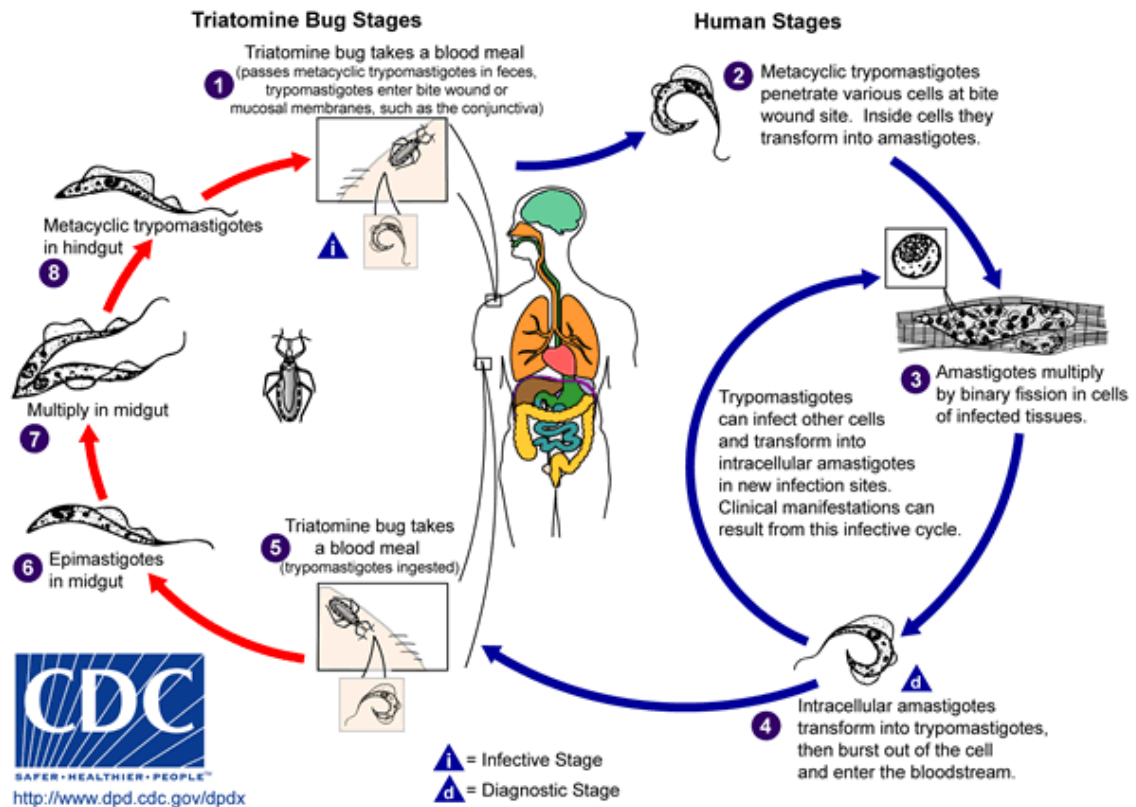


FIGURA 4: CICLO DA DOENÇA DE CHAGAS. FONTE: CDC (25)

O segundo mecanismo de transmissão com maior importância é via transfusão sanguínea (26). Com o aumento da migração de pessoas portadoras da enfermidade para países não-endêmicos, essa via de transmissão se tornou uma situação global. No Brasil, o primeiro caso de transmissão por essa via foi relatado por Freitas *et al* em 1952 *apud* (18), e, dados recentes (2010) afirmam que a taxa de prevalência da DC em doadores de sangue é de 0,18% (27).

O risco de transmissão por transfusão sanguínea depende de fatores epidemiológicos, como o nível de parasitemia do doador, o número e volume de transfusões recebidas, o tempo entre a coleta de sangue e a transfusão, o estado imunológico do receptor, entre outros. Além disso, através de uma única transfusão contendo 500 mL de sangue, a transmissão sanguínea do *T. cruzi* pode variar de 12% a 20%, e pode ocorrer também através de hemoderivados (28).

O transplante de órgãos representa um importante mecanismo de transmissão da DC, inclusive em áreas não-endêmicas, e, desde a evidência dessa via de transmissão, instituiu-se como medida de controle a triagem sorológica para DC antes da transfusão e antes de transplantes (28). As maiores incidências de doadores infectados com DC foram relatadas em

transplantes de rim e coração (29–32), entretanto, há relatos também em transplante de fígado e medula óssea (33,34).

Há, ainda, o risco de transmissão oral através da ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi* (açai, bacaba, carne de animais silvestres ingeridas mal cozidas etc). Essa modalidade de transmissão tem sido relatada com maior frequência em forma de surtos familiares no norte do Brasil (10). A transmissão pode ocorrer também por via congênita e os acidentes de laboratório (35).

1.2. Aspectos clínicos da doença de Chagas

A DC apresenta diferentes características clínicas conforme sua evolução. Logo após a infecção, inicia-se a fase aguda, na qual os parasitos entram na corrente sanguínea, infectando células como macrófagos e fibroblastos, onde se dividem por fissão binária e retornam à corrente sanguínea, resultando em grande quantidade de parasitos circulantes. O período de incubação varia entre oito a dez dias, e a parasitemia elevada pode persistir por quatro a oito semanas, reduzindo-se naturalmente. As manifestações clínicas desta fase, quando presentes, são altamente variáveis. Podem surgir sintomas inespecíficos, como febre, mal-estar e cefaleia até quadros com hepatomegalia/esplenomegalia, linfonodomegalia e sintomas cardíacos (18). Nos casos amazônicos de transmissão oral, além do período de incubação ser menor do que na transmissão clássica, os sintomas costumam apresentar-se com maior gravidade, de forma que a letalidade pode chegar a 5% (35). Indivíduos com a imunidade comprometida podem sofrer reativação da DC, com o aparecimento de sintomas graves que atingem o coração ou sistema nervoso central (36).

Na evolução natural da fase aguda não tratada segue-se a fase crônica, com parasitemia baixa e intermitente, e o surgimento de anticorpos IgG. Pode haver ou não manifestações clínicas específicas. A confirmação do diagnóstico laboratorial acompanhada por ausência de alterações nos exames eletrocardiográficos e radiológicos caracteriza a forma indeterminada da DC, que acomete de 50% a 70% dos doentes crônicos observados em estudos longitudinais em áreas endêmicas com transmissão vetorial ativa (37).

A forma digestiva da DC acomete de 15% a 20% de indivíduos em área endêmica (38). As complicações mais comuns são o megaesôfago e megacólon, que resultam em sintomas como disfagia, sialorréia, soluços, odinofagia, regurgitação, sensação de sufocação noturna, pneumonia aspirativa, desnutrição; constipação, diarreia paradoxal, disquesia,

distensão abdominal e fecaloma, respectivamente (27). Devido às lesões causadas pelo parasito no sistema nervoso autônomo ao longo de todo o trato gastrointestinal, podem ocorrer ainda, alterações anátomo-funcionais das glândulas salivares, estômago, das vias biliares extra-hepáticas, do duodeno e do intestino delgado (27). O tratamento dos sintomas consiste em aconselhamento e educação em saúde, adequação dos hábitos alimentares, utilização de medicamentos, dilatação/lavagem e, em casos mais graves, intervenção cirúrgica (27).

A forma cardíaca da DC apresenta altos índices de morbimortalidade, diminuindo a qualidade e expectativa de vida do doente. Estudos epidemiológicos indicam que de 10% a 30% de indivíduos portadores da DC apresentam alterações cardiológicas (37), resultado da remodelação cardíaca consequente à fibrose, levando à cardiopatia dilatada, com disfunção sistólica e diastólica, associada à insuficiência cardíaca, arritmias, com risco de morte súbita, que é a principal causa de óbitos em pacientes com a forma cardíaca da DC (39).

As formas digestivas e cardíacas podem ocorrer concomitantemente, caracterizando a forma mista da DC, entretanto, não se sabe exatamente sua prevalência (40). É importante ressaltar que, independente da forma clínica expressa pelo indivíduo, o *T. cruzi* apresenta-se tanto no tecido cardíaco como no tecido gastrointestinal do indivíduo infectado (41), sendo os principais fatores envolvidos na expressão da forma clínica o estado imunológico do indivíduo e a cepa do parasito (42).

1.3. Reativação da doença de Chagas

A reativação da DC é definida como o surgimento de sintomas característicos da fase aguda em indivíduos com a DC crônica, resultante da depressão ou supressão do sistema imune (36). A principal característica da reativação da DC é o aumento da carga parasitária por *T. cruzi*, detectado por testes parasitológicos diretos em amostra de sangue (43). Pacientes transplantados que sofrem reativação da DC apresentam, na maioria das vezes, lesões cutâneas, febre, mal-estar (44,45) e envolvimento cardíaco (46). Em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), os quadros costumam apresentarem-se mais graves, com envolvimento do sistema nervoso central (47–49). Em um estudo realizado na Argentina, foram analisados os principais sintomas de 15 pacientes chagásicos co-infectados com HIV: 73% apresentaram dor de cabeça, 60% apresentaram déficit neurológico focal, 60% apresentaram febre, 47% apresentaram meningismo, 47% apresentaram convulsões, 33%

apresentaram estado mental alterado e 30% apresentaram concomitante envolvimento cardíaco (50). No Brasil, Almeida *et al* (2010) (51) seguiram 20 pacientes chagásicos co-infectados com HIV, e verificaram que destes, 13 pacientes apresentavam a forma indeterminada da DC e sete apresentavam a forma cardíaca. Dos 13 pacientes com forma indeterminada, nove mantiveram essa forma e quatro sofreram alteração do status, sendo que um evoluiu para a forma digestiva da DC e três sofreram reativação da DC com manifestações do sistema nervoso central.

A monitorização da parasitemia pelo *T. cruzi* em pacientes com a DC e com a imunidade comprometida é indispensável, pois permite a detecção precoce da reativação e a instituição do tratamento adequado.

1.4. Resposta imune contra o *Trypanosoma cruzi*

Na infecção humana por *T. cruzi*, o principal mecanismo de defesa contra o parasito é a fagocitose. No entanto, macrófagos não ativados podem controlar a infecção em uma proporção de 5:1 parasitos por célula, mas, se a proporção for de 10:1 parasitos por célula, o macrófago é destruído (52). A resposta imune varia entre a fase aguda – produção de anticorpos e ativação de mecanismos da imunidade inata – e na fase crônica – produção de citocinas antiinflamatórias - (53). Foi constatado também, que a resposta imune sofre alterações após a instituição do tratamento com benznidazol, com menor ativação do sistema imune e contagem de células T reguladoras (54).

1.5. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da DC representa um desafio para clínicos e pesquisadores, uma vez que não há técnica de diagnóstico padrão-ouro (55). Para o diagnóstico da DC, são consideradas evidências clínicas e epidemiológicas, os testes laboratoriais, exames eletrocardiográficos e de imagens (27).

Diagnóstico laboratorial da fase aguda

Devido à alta parasitemia característica da fase aguda da DC, o diagnóstico é realizado por métodos parasitológicos, diretos ou indiretos.

O método parasitológico direto consiste na visualização de formas tripomastigotas do *T. cruzi* em sangue periférico. Pode ser realizado a fresco, em gota espessa ou esfregaço corado pelo método Giemsa (Figura 5); por métodos de concentração, como o microhematócrito, Strout e *quantitative buffy coat* (QBC) (27,56).

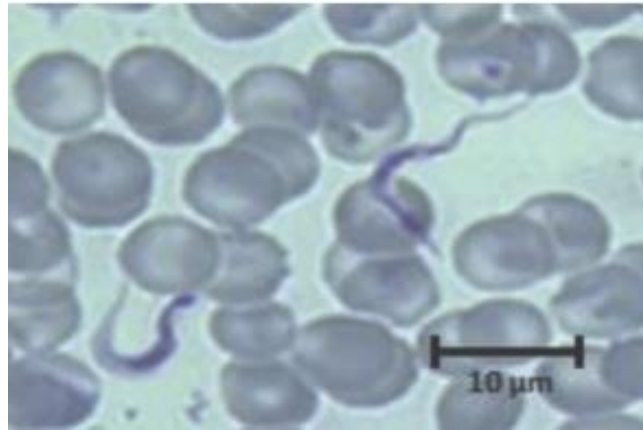


FIGURA 5: FORMAS TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEAS DO *T. CRUZI*, CORADO PELO MÉTODO GIEMSA. FONTE: ABEGG ET AL (57)

Os métodos parasitológicos indiretos incluem xenodiagnóstico e hemocultura. O xenodiagnóstico clássico é baseado na criação de triatomíneos em laboratório, onde as ninfas não infectadas são colocadas em contato com a pele para se alimentarem do sangue do paciente supostamente infectado. A presença das formas epimastigotas de *T. cruzi* no intestino do inseto, visualizada através de microscópio óptico, confirma a infecção. Apresenta inconvenientes como ser um teste trabalhoso, com resultados tardios e possibilidade de resposta alérgica à saliva do inseto (58).

A hemocultura é baseada na inoculação de sangue do paciente em meio de cultura enriquecido com nutrientes ideais para o desenvolvimento de *T. cruzi*, para posterior visualização microscópica do parasito. O meio de cultura mais utilizado é o *Liver Infusion Tryptose* (LIT), que é composto por infusão de fígado, triptose, soro bovino, solução de hemoglobina, glicose e sais variados (59). Fatores como a quantidade de sangue coletada, o número de coletas, o período de análise microscópica, o período entre coleta e semeadura e a

temperatura da amostra influenciam diretamente na sensibilidade da técnica, que pode variar entre 0% e 97,4% (60–64). Os resultados da análise demoram entre 120 e 150 dias, e por isso é usada como método complementar em casos especiais. Além disso, através da técnica de hemocultura foi possível estudar os aspectos químicos, bioquímicos e morfológicos do *T. cruzi*. Sua utilização é também essencial no processo de genotipagem do *T. cruzi*, pois possibilita a obtenção de grande quantidade de parasitos para os estudos moleculares (21,65).

Testes imunológicos que detectem anticorpos da classe IgM que caracterizem infecção aguda, também podem ser utilizados no diagnóstico da fase aguda da DC (27).

Diagnóstico laboratorial da fase crônica

Na fase crônica da DC, a parasitemia diminui e ocorre a produção gradual de anticorpos da classe IgG. Logo, o diagnóstico da fase crônica baseia-se na detecção dessa classe de anticorpos. Diferentes técnicas podem ser utilizadas, com recomendação da utilização de dois métodos imunológicos com princípios diferentes (66). As técnicas convencionais são ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), hemaglutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IFI) (27). A utilização de apenas um método apresenta sensibilidade e especificidade em torno de 98%, mas quando utiliza-se duas técnicas diferentes concomitantemente, a sensibilidade aumenta para 100% (67).

A técnica de ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *T. cruzi*, obtidos a partir de cultura *in vitro* (ou antígenos recombinantes de *T. cruzi*). Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos (controles do teste e das amostras são adicionados posteriormente). Os anticorpos específicos presentes no soro vão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre, quando adicionada uma anti-imunoglobulina marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado sororreagente é que apresenta o valor da densidade óptica igual ou superior ao ponto de corte (Cut-Off) do resultado do controle negativo (27).

Na técnica de hemaglutinação, hemácias de carneiro são sensibilizadas e fixadas com um extrato antigênico de *T. cruzi*. As hemácias sensibilizadas são depositadas em placas com soro-teste em diferentes diluições. Os anticorpos anti-*T. cruzi*, se presentes no soro, irão promover a aglutinação das hemácias formando uma rede. Essa técnica é usualmente

empregada na triagem de doadores em bancos de sangue, e a sensibilidade é comparável à da IFI (27).

No teste de IFI, as amostras são distribuídas sobre orifícios de lâminas próprias para imunofluorescência, secos à temperatura ambiente e incubados a 37°C por uma hora. Após três lavagens de cinco a 10 minutos com PBS, as lâminas são incubadas com um conjugado fluoresceinado anti-IgG ou anti-IgM humana por 60 minutos, novamente lavadas para remoção do conjugado não ligado, montadas em glicerina alcalina e observadas em microscópico de fluorescência. Recomenda-se fazer um controle positivo e negativo para cada lâmina. (68).

Outros testes sorológicos (quimioluminescência, testes com antígenos recombinantes) podem ser utilizados, desde que em conjunto com os testes convencionais (27,69).

Diagnóstico molecular da doença de Chagas

O diagnóstico molecular da DC é realizado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica foi descrita por Saiki (1988) (70) para diversas aplicações, inclusive para a detecção de patógenos. Consiste na amplificação enzimática de um fragmento de DNA (*primer*), específico do microrganismo alvo. A reação é realizada em diversos ciclos constituídos por três etapas: 1) separação da dupla fita do DNA, 2) anelamento dos *primers* às suas sequências complementares e 3) extensão dos *primers* anelados pela ação da enzima DNA polimerase; resultando em um aumento exponencial da quantidade de fragmento de DNA, gerando milhões de cópias.

Convém salientar que, para realização da técnica, é possível utilizar fragmentos do DNA do cinetoplasto ou do DNA nuclear do *T. cruzi*. O DNA do cinetoplasto é organizado em moléculas circulares, denominadas maxicírculos e minicírculos. Cada minicírculo possui aproximadamente 1,4 Kb, organizados em quatro segmentos, que consistem em uma pequena região de DNA com alto nível de sequências conservadas entre todos minicírculos do tripanosoma e uma longa sequência de DNA, exibindo sequências altamente variáveis, que apresentam alta taxa de mutação e podem diferir entre as diferentes cepas do parasito (13,14). O DNA nuclear (satélite) corresponde a 10% do DNA total do parasito e apresenta regiões repetitivas que correspondem a aproximadamente 200 Kb (71). A escolha da região do DNA a ser utilizada é um fator que pode influenciar na sensibilidade da técnica (72,73).

A sensibilidade da PCR é comparável à dos métodos sorológicos, sendo que, através da PCR, Gilber *et al* (74) conseguiram confirmar a infecção em cinco doentes com sorologia inconclusiva para a DC. Em outro estudo, Marcon *et al* (2002) (75) analisaram 30 pacientes com sorologia duvidosa para DC pela *Nested-PCR* para região do DNA nuclear do *T. cruzi*, e encontraram 13 casos positivos. Em pacientes portadores do megasôgato e megacólon chagásico e com sorologias duvidosas, Batista *et al* (2010) (76) encontraram 31/41 (75%) de amostras positivas utilizando também a *Nested-PCR* para região do DNA nuclear do *T. cruzi*.

A especificidade da PCR é alta, pois, tanto a região do DNA satélite quanto do kDNA são específicas do *T. cruzi* (77,78). A PCR pode ser útil como critério de cura em indivíduos que foram submetidos ao tratamento específico para DC, e para analisar a parasitemia de indivíduos com a imunidade comprometida, que podem apresentar resultados sorológicos falso-negativos devido à baixa produção de anticorpos (27).

A PCR convencional apresenta desvantagens como o tempo para a realização, risco de contaminação cruzada que pode ocorrer entre as etapas do processo e a impossibilidade de obter resultados quantitativos (79).

Com os avanços da biologia molecular, variações da técnica de PCR foram descritas. A mais relevante têm sido a PCR quantitativa (qPCR), na qual é possível quantificar o número de organismos em determinada amostra biológica. Para isso, durante a reação, utiliza-se uma sonda fluorescente que se anela entre os fragmentos de DNA, gerando um sinal fluorescente que é lido pelo equipamento. A quantidade de fluorescência emitida é proporcional à quantidade de produto da PCR gerado ao final da amplificação. Para a análise dos resultados, o software gera uma curva, a qual é utilizada para definir a fase exponencial da reação, e assim calcular o número de cópias presentes no início da reação (80).

A quantificação da carga parasitária através da qPCR tem especial relevância como critério de cura em pacientes submetidos ao tratamento específico para DC, monitorizar a reativação da DC em pacientes com a imunidade comprometida e em casos de indivíduos que apresentam sorologia inconclusiva (81,82).

Apesar de apresentar vantagens como menor tempo para obtenção dos resultados e reduzido risco de contaminação, o diagnóstico molecular da DC pela qPCR ainda apresenta dificuldades, devido à ausência de um protocolo padronizado entre os laboratórios que a realizam. Em um estudo internacional, Schijman *et al* (83) analisaram a sensibilidade e especificidade de diversos protocolos para o diagnóstico molecular da DC. Os autores selecionaram quatro protocolos que apresentaram os melhores resultados, sendo dois de PCR convencional e dois de qPCR. Concluíram, ainda, que fatores como características

epidemiológicas das populações, volume de sangue coletado, método de extração de DNA, *primers* utilizados, condições da reação e também a quantidade de parasitos circulantes no momento da coleta podem interferir na sensibilidade da técnica.

1.6. Comprometimento imunológico na doença de Chagas

O crescente número de transplante de órgãos (rim, coração, fígado, medula óssea) e a utilização de drogas imunossupressoras em pacientes submetidos a esses procedimentos, os pacientes com neoplasias, doenças auto-imunes e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), tem levado a grande ocorrência de indivíduos imunossuprimidos, que estão predispostos às infecções oportunistas. Assim, é importante considerar a infecção pelo *T. cruzi* como potencial infecção oportunista nestes indivíduos (84). A doença de Chagas tem grande importância em pacientes transplantados, podendo ocorrer reativação devido à terapia com drogas imunossupressoras. A terapia preventiva com benznidazol previne a reativação precoce da infecção, evitando doença clínica grave que a alta parasitemia pelo *T. cruzi* pode produzir (85).

1.7. Tratamento específico para a doença de Chagas

Os primeiros compostos com atividade anti-*T. cruzi* descritos foram o nifurtimox (NF) e benznidazol (BZ), introduzidos na década de 60, e até os dias atuais representam um desafio aos profissionais de saúde devido à alta taxa de variação no sucesso terapêutico (86). A partir de 1980, o nifurtimox teve o uso suspenso no Brasil, devido à sua média atividade e altas taxas de reações adversas (86).

O benznidazol é o medicamento de escolha para o tratamento antiparasitário da DC no Brasil (27), promovendo taxas de cura de até 100% em crianças e até 60% em jovens e adultos com infecção recente (87). Dados da literatura sugerem que a eficácia do BZ seja maior na fase aguda do que na fase crônica, devido à grande quantidade de parasitos circulantes na corrente sanguínea do indivíduo infectado. A variação na eficácia do tratamento também pode ser atribuída a características de patogenicidade de acordo com a região geográfica em que o paciente foi infectado (88). Essa variação é evidenciada pela positividade de exames como sorologia, hemocultura e PCR após o tratamento com BZ (89,90).

O tratamento com BZ é indicado em todos os casos agudos e em crianças com a DC, em indivíduos com a fase crônica da DC de até 50 anos, para o controle da reativação da DC em indivíduos imunossuprimidos e em casos de acidentes laboratoriais envolvendo o *T. cruzi*. Em casos de gestação, o tratamento com BZ é contraindicado, a menos que a gestante apresente a fase aguda da DC, devendo a instituição do tratamento ser individualizada, assim como em chagásicos crônicos com grave doença cardíaca (27). A comprovação de cura é feita apenas por exames sorológicos, que devem apresentar negatificação ou redução persistente e progressiva de três diluições da titulação. A PCR pode ser utilizada como um método auxiliar para tal análise, sendo que a sua positividade representa falha terapêutica (27).

Além de apresentar taxas variadas de eficácia, o uso do BZ é questionável pelo fato deste composto apresentar reações adversas, como (1) hipersensibilidade, incluindo dermatite com erupção cutânea, mialgia, artralgia e linfadenopatia; (2) neuropatia com parestesia e polineurite; (3) distúrbios da medula óssea, entre outros. Em casos de reações adversas com maior gravidade, a medicação deve ser suspensa (87).

Estudos têm analisado a eficácia de outros compostos contra o *T. cruzi*, tais como alopurinol, itraconazole e posaconazole, mas apresentam resultados variáveis de acordo com a idade do paciente e a dosagem necessária para resultados satisfatórios. No entanto, a recomendação para tratamento da DC continua sendo o BZ (86).

1.8. Contexto do transplante renal no Brasil

O sistema de transplante de órgãos no Brasil é complexo e envolve diferentes autarquias como Ministério da Saúde e Sistema Nacional de Transplantes (SNT). Em 1997, foi criada a Lei nº 9.494, de 4 de fevereiro de 1997, que dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante (91).

Em 2016, a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (92) registrou em todo o Brasil 5.492 transplantes renais, sendo 1.200 de doadores vivos e 4.292 de doadores falecidos. O Estado de São Paulo foi onde ocorreu o maior número de transplantes, alcançando a marca de 2.049 procedimentos (92).

A alocação de órgãos de doador falecido é controlada pelas centrais estaduais, sendo o rim distribuído de acordo com a compatibilidade HLA (*human leucocyte antigen*). No caso de doador vivo, é permitido o transplante de órgãos de parentes até o quarto grau (grau I: pais e filhos, grau II: avós e irmãos, grau III: tios e sobrinhos, grau IV: primos e filhos de tios

consanguíneos), e também de cônjuges. Doador vivo não relacionado é permitido, porém necessita de trâmites como justificativa médica, autorização ética e judicial (93).

Para evitar a rejeição do enxerto, diversos fármacos imunossupressores podem ser empregados no período pós-transplante, sendo que a intensidade da imunossupressão depende do risco imunológico de cada transplante. Transplantes com doadores vivos HLA-idênticos recebem imunossupressores menos potentes, enquanto transplantes repetidos com doadores cadáveres recebem imunossupressores mais potentes (94).

O esquema de fármacos para indução da imunossupressão é composto por tacrolimo, azatioprina, prednisona e timoglobulina, além da utilização, em ambiente hospitalar, de globulina anti-timocítica (ATG) ou anticorpo monoclonal anti-CD3 (OKT3). No esquema de imunossupressão de manutenção, utiliza-se prednisona, azatioprina e ciclosporina ou tacrolimo. O uso de derivados de ácido micofenólico (micofenolato de mofetila ou de sódio) é indicado em situações específicas (95), pois, Bacal *et al* (2005) (96), verificaram que, em pacientes com transplante cardíaco e que utilizaram este imunossupressor tinham chances de reativação da DC seis vezes maior que pacientes que utilizaram azatioprina.

O período pós-operatório deve ser monitorizado constantemente para evitar e tratar possíveis complicações clínicas: ausência de função inicial do enxerto, rejeições, infecções (bacterianas, virais, fúngicas, protozoárias), metabólicas (obesidade, dislipidemias, diabetes melito), cardiovasculares (cardiopatia isquêmica e hipertensão arterial), imunológicas e ósseas, além de infecções oportunistas (94). A legislação brasileira não recomenda a utilização de órgãos de indivíduos portadores da doença de Chagas para fins de transplantes, dessa forma, é parte do protocolo pré-transplante a triagem sorológica para DC (27).

1.9. Relevância do estudo

Diante do que foi exposto até o momento, é possível verificar que vários fatores estão associados ao risco de reativação da DC em pacientes submetidos ao transplante renal, como a realização do tratamento específico com benznidazol, o tempo em que o transplante foi realizado e o esquema de imunossupressão utilizado. Nesse estudo, avaliou-se a carga parasitária pela técnica quantitativa de PCR em tempo real para analisar a parasitemia desses pacientes, e comparar os resultados com a técnica clássica de hemocultura. A partir dos resultados das duas técnicas, foi possível analisar se existe relação entre a carga parasitária

encontrada com a instituição do tratamento específico para DC, tempo de transplante e esquema de imunossupressão adotado.

2. Objetivos

2.1.Objetivo geral

- Quantificar a carga parasitária de *Trypanosoma cruzi* em pacientes submetidos ao transplante renal pela técnica de PCR em tempo real.

2.2.Objetivos específicos

- Comparar os resultados obtidos pela PCR em tempo real com resultados de hemocultura e sorologias;
- Relacionar a carga parasitária encontrada nesses pacientes com o tempo do transplante; esquema de imunossupressão e tratamento específico para a DC.

3. Casuística e Métodos

Este é um estudo descritivo observacional para relatar a carga parasitária por *T. cruzi* encontrada em pacientes submetidos ao transplante renal. Para coleta de dados e análise demográfica dos pacientes, foram analisados prontuários físicos e eletrônicos, disponibilizados pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital de Clínicas da Unicamp.

Para realização desta pesquisa, foram selecionados vinte e quatro pacientes, que foram divididos em dois grupos:

1 – Grupo A: composto por nove pacientes com sorologias reagentes ou inconclusivas para DC, transplantados renais, submetidos ao esquema de imunossupressão, tratados ou não para a DC;

2 – Grupo B: composto por quinze pacientes com diagnóstico positivo para DC, não transplantados, não submetidos ao tratamento imunossupressor e para a DC.

Estes pacientes foram atendidos pelo ambulatório do Grupo de Estudos em Doença de Chagas (GEDoCh) e pelo ambulatório de Nefrologia, ambos do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. Todos os pacientes aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética sob o número CAEE 45940515.5.0000.5404.

De cada paciente, foi coletado 30 mL de sangue para realização dos exames de qPCR e hemocultura. A coleta foi realizada por equipe de enfermagem no dia da consulta de cada paciente, dessa forma, não foi necessária a convocação dos pacientes.

3.1. Critérios de inclusão e exclusão

Todos os pacientes incluídos aceitaram participar do estudo. Para o grupo A, os critérios de inclusão foram: apresentar sorologia reagente ou inconclusiva para DC e ter sido submetido ao transplante renal. Foram excluídos os pacientes com sorologia não reagente para DC e que não foram submetidos ao transplante renal.

No grupo B, foram incluídos pacientes diagnosticados com a DC através de métodos laboratoriais, sem tratamento imunossupressor e para a DC. Foram excluídos pacientes com sorologia não-reagente para DC e aqueles com diagnóstico de DC mas que realizaram o tratamento específico para o *T. cruzi*.

3.2 .Testes laboratoriais

3.2.1. Testes sorológicos

Os testes sorológicos para confirmação da DC foram realizados pelo laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Unicamp rotineiramente. Conforme é preconizado pela Organização Mundial da Saúde (66), foram realizadas duas técnicas concomitantes dentre quimioluminescência ou ELISA e imunofluorescência indireta.

3.2.2. Hemocultura

A técnica de hemocultura foi baseada nos protocolos de Chiari *et al* (1989) e Luz *et al* (1999). A técnica foi realizada com 24 mL de sangue venoso, coletado em quatro tubos a vácuo contendo EDTA (6 ml). O sangue foi centrifugado a 1903 g durante 10 minutos a 4°C, o plasma removido e as hemácias lavadas com meio LIT acrescido de 10% soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina. O sobrenadante foi removido e o sedimento de hemácias homogeneizado com 6 mL de LIT. As culturas foram mantidas em estufa a 28°C e o exame microscópico 40 x realizado a cada 15 dias até positividade, ou até completar o período de 120 dias. A visualização do *T. cruzi* na amostra através da microscopia define a positividade da técnica, e a quantidade de tubos em que o parasito é encontrado permite uma semi-quantificação do parasito na amostra.

3.2.3. Testes moleculares

Extração de DNA

Para o isolamento do DNA dos pacientes, cada amostra de sangue de 6 mL foi centrifugada a 752 g, com tampão de lise de hemácias (NH₄Cl + NH₄HCO₃), e posteriormente

com TKM1 (Tris-HCl 2M + KCl 1M + MgCl₂ + EDTA 0,2 + H₂O) e Triton para obtenção do *buffy coat*.

A extração de DNA prosseguiu com a utilização do Kit Comercial High Pure PCR Template Preparation (Roche®). A um tubo de microcentrifuga, foram adicionados 200 µL do *buffy coat* obtido, 200 µL de tampão de ligação e 40 µL de Proteinase K, previamente reconstituída. A mistura foi homogeneizada e incubada a 70°C por, no mínimo, 10 minutos. À mistura foram adicionados 100 µL de isopropanol e homogeneizada novamente. A mistura foi transferida para a coluna e centrifugada por 1 minuto a 8.000 g. Adicionou-se 500 µL de tampão inibidor e centrifugou-se sob as mesmas condições. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens seguidas com 500 µL de tampão de lavagem e centrifugação por 1 minuto a 8.000 g. O DNA foi eluído em 200 µL de tampão de eluição e armazenado a -20°C até a utilização.

A extração do DNA da cultura de *T. cruzi* para confecção da curva padrão foi realizada como descrito anteriormente. A concentração dos DNAs obtidos foi determinada em espectrofotômetro (Nano drop 1000, Thermo Scientific®).

PCR quantitativa (qPCR)

Curva padrão

Para construção da curva padrão, formas tripomastigotas de *T. cruzi* (DTU TCII) foram obtidas de paciente chagásico através do cultivo em meio LIT. Ao atingir a fase exponencial de crescimento, formas epimastigotas foram contadas em câmara de Neubauer, e quantificados em $1,25 \cdot 10^7$ parasitos/mL. A partir dessa contagem, a cultura foi submetida à extração de DNA (conforme item anterior), e, com o DNA eluído, foram realizadas diluições seriadas, do ponto inicial, $1,25 \cdot 10^7$ até $1,25 \cdot 10^{-3}$. Na curva padrão considerada neste trabalho, foram utilizados os pontos $1,25 \cdot 10^5$ a $1,25 \cdot 10^{-1}$, totalizando sete pontos.

Quantificação das amostras analisadas por qPCR

A técnica de qPCR foi baseada no protocolo de Píron *et al* (2007) (97), e padronizada no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas Por Técnicas de Biologia Molecular-FCM - Unicamp por Batista (2014) (98). Os primers utilizados foram *Cruzi 1* e *Cruzi 2*, que

amplificam um segmento de 166 pares de bases do DNA satélite do *T. cruzi*. A sonda Cruzei 3 foi marcada com o fluoróforo 5'FAM 3'. As condições de cada reação da qPCR foram: 1x Taqman Universal Master Mix com UNG (Applied Biosystems), RNase P 0,1x (Applied Biosystems), 500 nM de cada primer (Cruzei 1 e Cruzei 2), 200 nM da sonda (Cruzei 3) e 3 µL de DNA, totalizando 30 µL. O equipamento utilizado foi o Rotor-Gene 6000 (Corbett® Life Science), e as reações foram submetidas às seguintes condições: primeiro ciclo (2 minutos a 50°C), segundo ciclo (10 minutos a 95°C) e 45 ciclos (15 segundos a 95°C e 1 minuto a 58°C). A integridade das amostras de DNA foi comprovada pela amplificação do controle interno (gene humano RNase P). Os resultados da quantificação foram gerados pelo software Rotor-Gene 1.7.87.

Validação da PCR quantitativa

Diversos parâmetros podem ser analisados para validar um procedimento analítico. Neste estudo, utilizou-se como base para uma análise comparativa com os resultados encontrados, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).

O limite de detecção de um método é a menor quantidade de analito que pode ser detectado e não necessariamente quantificado (99,100). Para calcular o limite de detecção da qPCR, foi realizada uma corrida dos pontos da curva padrão $1,25 \cdot 10^{-1}$, $1,25 \cdot 10^{-2}$ e $1,25 \cdot 10^{-3}$, em triplicata. Enquanto os pontos $1,25 \cdot 10^{-2}$ e $1,25 \cdot 10^{-3}$ apresentaram variação nos resultados, o ponto $1,25 \cdot 10^{-1}$ apresentou sinal detectável nas três replicatas. Foi realizada uma nova corrida com 21 replicatas do ponto $1,25 \cdot 10^{-1}$, que apresentaram sinal detectável em todas as replicatas. Dessa forma, o limite de detecção da técnica de qPCR do presente estudo foi o ponto menos concentrado que apresentou sinal de amplificação em todas as replicatas a que foi submetido, ou seja, o ponto $1,25 \cdot 10^{-1}$.

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinado quantitativamente com precisão e acurácia. Há diversas formas para calcular o LQ, entretanto, quase todos são através do desvio padrão de amostras brancas (99). Nesse caso, não foi possível calcular o LQ com base nessa forma, uma vez que, no termociclador utilizado (Corbett®), as amostras brancas não geram sinal de fluorescência e, consequentemente, não é possível calcular o desvio padrão. O LQ pode ser calculado baseado em uma avaliação visual, que consiste na análise de amostras com concentrações conhecidas de analito, estabelecendo um nível mínimo em que este analito pode ser quantificado com

precisão e acurácia (99). Sendo assim, estabeleceu-se o mesmo método para calcular LQ e LD.

3.2. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo setor de Estatística – FCM – Unicamp. A análise das variáveis categóricas entre os grupos foi realizada pelo teste exato de Fischer, e a análise das variáveis numéricas (hemocultura e qPCR) foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Os dois testes foram realizados no software The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.4. SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA.

4. Resultados

4.1. Perfil dos pacientes

Grupo A

Entre os nove pacientes portadores da DC e que realizaram o transplante renal, cinco foram do gênero feminino e quatro do gênero masculino. A média de idade foi 51 ± 11 anos. Em relação à sorologia, seis apresentaram sorologias positivas e três apresentaram sorologia inconclusiva (Tabela 1).

Apenas um paciente apresentou a forma cardíaca da DC, cinco apresentaram a forma indeterminada e, em três casos (que apresentaram sorologia inconclusiva), não havia informações sobre a forma clínica da DC no prontuário, uma vez que o diagnóstico laboratorial não foi confirmado (Tabela 1).

Quanto à origem, os pacientes são provenientes dos estados de Minas Gerais (4), São Paulo (2), Paraíba (1), Bahia (1) e Paraná (1) (Tabela 1).

Paciente	Gênero	Idade	Estado Origem	Forma Clínica	Ano de Tratamento	Sorologia
MCBS	Feminino	66	Paraíba	I	1996	QLM: R IFI: > 1/40
VLC	Feminino	40	Minas Gerais	C	2013	QLM: R IFI: > 1/40
AMC	Feminino	51	Bahia	SI	SI	Elisa: Inc IFI: NR
ICS	Masculino	41	São Paulo	SI	SI	Elisa: R IFI: NR
GCL	Masculino	63	Paraná	I	2010	QML: R IFI: R
ISL	Feminino	35	Minas Gerais	I	2011	QML: R IFI: R

JRO	Masculino	47	Minas Gerais	I	2013	QLM: R IFI: > 1/40
LDRB	Feminino	55	Minas Gerais	SI	SI	Elisa: NR QML: Inc
SCSF	Masculino	67	São Paulo	I	2016	QLM: R IFI: > 1/40

TABELA 1: PERFIL DOS PACIENTES DO GRUPO A. I: INDETERMINADA; C: CARDÍACA; SI: SEM INFORMAÇÃO; QML: QUIMIOLUMINESCÊNCIA; IFI: IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA; R: REAGENTE; INC: INCONCLUSIVA; NR: NÃO REAGENTE.

As informações sobre doença renal de base antes do transplante, ano do transplante, tipo de doador e esquema de imunossupressão adotado estão descritos na Tabela 2.

Paciente	Doença de Base	Ano do Transplante	Tipo de doador	Esquema imunossupressão
				Azatioprina
MCBS	IRC Pielonefrite	1996	Aparentado	Prednisona Ciclosporina
				Tacrolimo
VLC	IRC Indeterminada	2015	Cadáver	Micofenolato de Mofetila Prednisona
				Tacrolimo
AMC	GNC	2010	Cadáver	Micofenolato de Mofetila Prednisona
				Tacrolimo
ICS	Glomeruloesclerose Focal	2010	Cadáver	Micofenolato de Sódio Prednisona
				Tacrolimo
GLC	Nefropatia diabética	2011	Cadáver	Micofenolato de Mofetila

				Prednisona
				Tacrolimo
ISL	GNC	2014	Cadáver	Micofenolato de Mofetila
				Prednisona
				Tacrolimo
JRO	GNC	2014	Cadáver	Micofenolato de Mofetila
				Prednisona
				Micofenolato de Mofetila
LDRB	GNC	2002	Cadáver	Prednisona
				Basiliximabe
				Metilprednisolona
SCSF	DRC por AINE	2016	Cadáver	Tacrolimo
				Micofenolato de Sódio

TABELA 2: CARACTERÍSTICAS DO TRANSPLANTE DE CADA PACIENTE. IRC: INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA; GNC: GLOMERULONEFRITE CRÔNICA; DRC: DOENÇA RENAL CRÔNICA; AINE: ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDE.

Grupo B

O grupo B foi composto por 15 pacientes, dos quais nove eram do gênero feminino e seis do gênero masculino. A média de idade foi 54 ± 12 anos. Dos pacientes do grupo B, apenas um apresentou resultados sorológicos negativos, mas, neste caso, foi diagnosticado pela técnica de PCR externa à Unicamp, por ser proveniente de área endêmica e também por apresentar a forma digestiva da DC. Em 14 pacientes a sorologia foi positiva (Tabela 3).

Em relação à forma clínica da DC, cinco apresentaram a forma digestiva, quatro apresentaram a forma indeterminada, três apresentaram a forma cardíaca e três apresentaram a forma mista. Os pacientes desse grupo não realizaram tratamento específico para a DC (Tabela 3).

Em relação à origem, os pacientes são provenientes dos estados de Minas Gerais (7), São Paulo (2), Bahia (2), Paraná (2) e Pernambuco (2) (Tabela 3).

Paciente	Gênero	Idade	Estado Origem	Forma Clínica	Tratamento	Sorologia
TGFN	Masculino	64	Minas Gerais	CD	Não	QLM: R IFI: > 1/40
MGF	Masculino	57	Minas Gerais	I	Não	QLM: R IFI: > 1/40
MFS	Feminino	69	Pernambuco	I	Não	QLM: R IFI: > 1/40
MFLA	Feminino	50	Paraná	CD	Não	QLM: R IFI: > 1/40
MAB	Feminino	68	Minas Gerais	CD	Não	QLM: R IFI: 1/1280
MRA	Feminino	24	Minas Gerais	D	Não	QLM: NR IFI: NR
NDC	Masculino	60	Bahia	D	Não	QLM: R IFI: 1/40
SSSS	Feminino	48	Minas Gerais	C	Não	QLM: R IFI: > 1/40
JASS	Feminino	73	São Paulo	D	Não	QLM: R IFI: > 1/40
MCS	Feminino	63	São Paulo	I	Não	QLM: R IFI: > 1/40
RLC	Masculino	51	Minas Gerais	I	Não	QLM: R IFI: > 1/40
JNGF	Masculino	43	Pernambuco	D	Não	QLM: R IFI: > 1/40
CAM	Masculino	49	Bahia	D	Não	QLM: R IFI: > 1/40
NVA	Feminino	47	Minas Gerais	C	Não	QLM: R IFI: R
GS	Feminino	48	Paraná	C	Não	QLM: R IFI: > 1/40

TABELA 3: PERFIL DOS PACIENTES DO GRUPO B. CD: CARDIODIGESTIVA; I: INDETERMINADA; D: DIGESTIVA; C: CARDÍACA; QML: QUIMIOLUMINESCÊNCIA; IFI: IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA; R: REAGENTE; NR: NÃO REAGENTE.

4.2. Hemocultura

A técnica de hemocultura foi realizada em todos os pacientes do grupo A e do grupo B. No grupo A, todas as hemoculturas foram negativas, enquanto que no grupo B houve quatro hemoculturas positivas (26%). Todas as quatro hemoculturas positivas foram em pacientes do gênero feminino (Tabela 4). Em três pacientes, o parasito foi encontrado apenas em um tubo, dos quatro que foram cultivados. Em um caso, o parasito foi encontrado em três dos quatro tubos cultivados, demonstrando parasitemia alta. A média de tempo para positividade das amostras foi de $97,5 \pm 28$ dias.

Pacientes	Grupo A	Grupo B
Hemocultura positiva	-	4
Hemocultura negativa	09	11
Total	09	15

TABELA 4: RESULTADOS DA HEMOCULTURA PARA O *T. CRUZI* POR GRUPO.



FIGURA 6: FORMAS EPIMASTIGOTAS DO *T. CRUZI* EM REPIQUE DE HEMOCULTURA POSITIVA.

4.3. Testes moleculares

A concentração de DNA das amostras foi determinada em espectrofotômetro (Nano drop 1000, Thermo Scientific®). As amostras apresentaram um baixo rendimento, ao se comparar com o rendimento dos resultados experimentais fornecidos pelo Kit High Pure PCR Template Preparation Roche® (rendimento de 20 µg para amostra de 200 µl de *buffy coat*) (Tabelas 5 e 6):

Grupo A			
Paciente	ng/µl	260/280 nm	260/230 nm
MCBS	6,2	0,62	0,14
VLC	41,2	1,10	0,30
AMC	9,5	2,17	4,78
ICS	11,3	1,49	0,84
GLC	10,1	1,92	1,48
ISL	9,5	1,23	0,39
JRO	7,5	1,05	0,25
LDRB	6,6	1,39	0,54
SCSF	13,5	1,11	0,34

TABELA 5: CONCENTRAÇÃO E ABSORBÂNCIA OBTIDAS NA EXTRAÇÃO DE DNA DOS PACIENTES DO GRUPO A.

Grupo B			
Paciente	ng/µl	260/280 nm	260/230 nm
TFGN	10,3	1,97	1,39
MGF	8,1	2,04	2,02
MFS	27,1	2,03	1,83

MFLA	17,4	1,99	1,62
MAB	36,3	1,91	1,24
MRA	16,9	2,16	1,48
NDC	15,0	1,93	0,86
SSSS	7,7	1,38	0,33
JASS	15,5	1,36	0,51
MCS	4,5	1,92	-2,29
RLC	5,9	1,78	3,13
JNGF	24,0	1,97	2,64
CAM	88,0	1,97	2,10
NVA	27,8	1,85	1,23
GS	13,1	1,85	1,34

TABELA 6: CONCENTRAÇÃO E ABSORBÂNCIA OBTIDAS NA EXTRAÇÃO DE DNA DOS PACIENTES DO GRUPO B.

PCR em tempo real

Curva padrão

Conforme demonstrado nas Figuras 7 e 8, a curva padrão utilizada nesse estudo apresentou linearidade nos pontos $1,25 \cdot 10^5$ a $1,25 \cdot 10^{-1}$. Os parâmetros analisados ficaram dentro do padrão esperado para a confiabilidade dos resultados. A eficiência encontrada foi de 0,96 (valor ideal = 0,90- 1,00), slope -3,42 (valor ideal = -3,32), R^2 0,99 (valor ideal = 0,99). A eficiência foi calculada pelo software, de acordo com a fórmula $E = 10^{-1(\text{slope})} - 1$.

Os pontos da curva foram feitos em triplicata e uma amostra sem DNA (*no template control* – NTC) foi adicionada à reação para confirmar a ausência de contaminantes.

O limite de quantificação do método de qPCR foi 0,1 parasito/ml, e as amostras que apresentaram valor abaixo do limite de quantificação não puderam ser quantificadas.

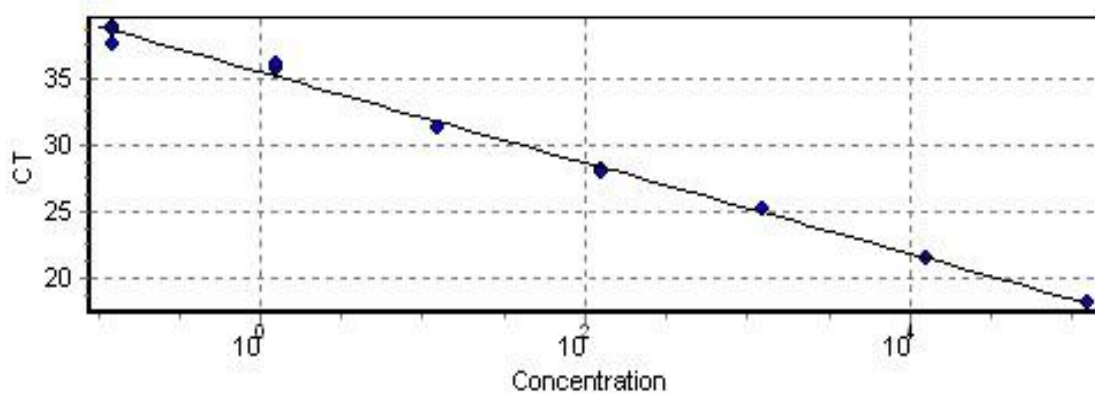


FIGURA 7: RETA DA CURVA PADRÃO, APRESENTANDO LINEARIDADE ENTRE OS PONTOS 10^5 À 10^{-1} .

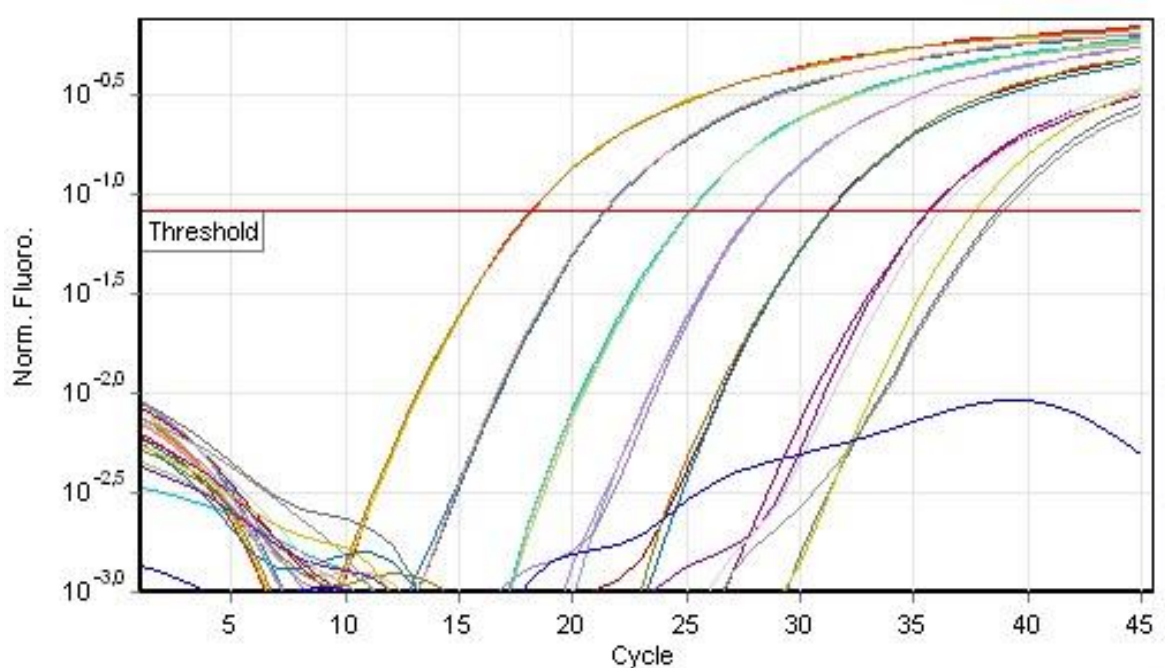


FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA PADRÃO DA PCR EM TEMPO REAL.

Quantificação das amostras (qPCR)

Em cada corrida para quantificação do *T. cruzi* nos pacientes dos grupos A e B, foram utilizadas, além de cada amostra em duplicata, um ponto intermediário da curva padrão e uma

amostra NTC, para confirmar que não houve contaminação durante a realização do procedimento. A integridade das amostras de DNA foi confirmada pelo uso de um controle interno, o gene da RNase P.

O cálculo das concentrações finais obtidas foi baseado na seguinte fórmula:

$$\text{Resultado (cópia por ml)} = \frac{\text{dado obtido na corrida} \times \text{volume eluição da amostra}}{\text{volume de amostra na extração}}$$

Conforme é possível verificar nas Tabelas 7 e 8, apenas três amostras do grupo B foram quantificadas em 0,1 parasito/ml, enquanto as outras doze amostras do grupo B e sete do grupo A apresentaram a quantificação menor do que o limite de quantificação da técnica ($1,25 \cdot 10^{-1}$). Isso significa que as amostras apresentaram sinal de fluorescência, mas em um ciclo tardio, porém, a curva gerada pelo software se assemelha muito à da curva padrão (Figura 9). Dessa forma, tais amostras foram consideradas positivas, porém não quantificáveis. Duas amostras do grupo A não apresentaram sinal de fluorescência, e, portanto, foram consideradas negativas.

Grupo A		
Paciente	Quantificação	Ciclo Threshold
MCBS	0,0021	40,2
VLC	Negativo	-
AMC	0,0018	40,1
ICS	Negativo	-
GLC	0,0008	41,8
ISL	0,01	38,5
JRO	0,0017	40,1
LDRB	0,0018	39,9
SCSF	0,0051	38,5

TABELA 7: QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES DO GRUPO A, OBTIDAS PELA TÉCNICA DE qPCR.

Grupo B		
Paciente	Quantificação	Ciclo Threshold
TFGN	0,0030	35,4
MGF	0,0003	38,5
MFS	0,0017	37,9
MFLA	0,0028	40,9
MAB	0,0002	38,9
MRA	0,0002	39,4
NDC	0,0016	41,8
SSSS	0,0003	40,3
JASS	0,0176	37,2
MCS	0,0005	41,9
RLC	0,033	35,4
JNGF	0,0067	37,7
CAM	0,11	33,7
NVA	0,134	33,3
GS	0,117	33,9

TABELA 8: QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES DO GRUPO B, OBTIDAS PELA TÉCNICA DE qPCR.

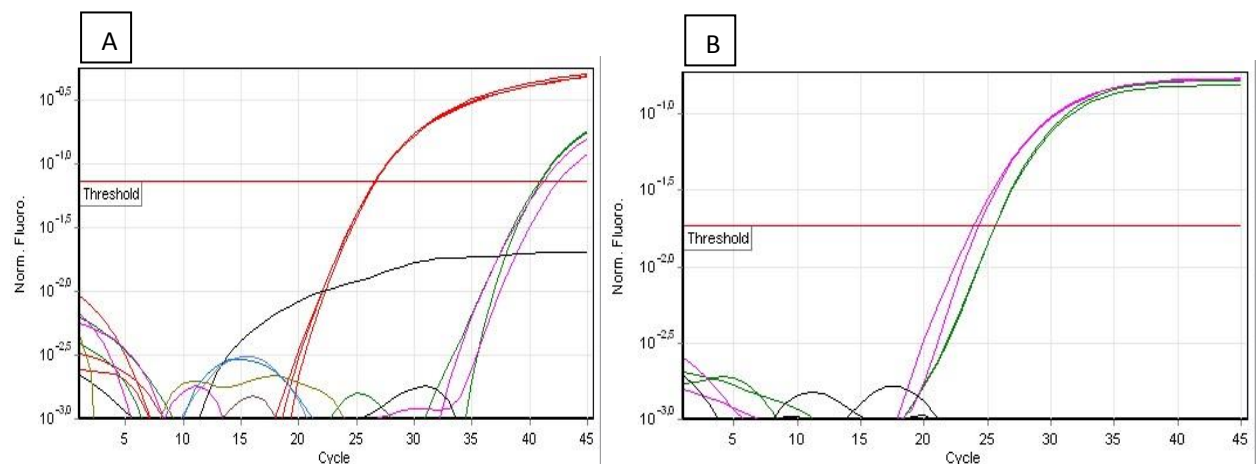


FIGURA 9: EXEMPLO DE DUAS AMOSTRAS COM A QUANTIFICAÇÃO ABAIXO DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO. A- EM VERMELHO: PONTOS DA CURVA PADRÃO EM TRIPLICATA, VERDE

E ROSA: AMOSTRAS EM DUPLICATA SENDO DETECTADAS EM CTs TARDIOS. B: VERDE E ROSA: AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA RNASE P, DEMONSTRANDO A INTEGRIDADE DOS DNAs.

Comparação entre as técnicas de qPCR, hemocultura e tratamento com benznidazol

Com o intuito de analisar a concordância dos resultados entre as duas técnicas, foi realizada uma comparação entre os resultados e o tratamento com benznidazol, tanto dos pacientes do grupo A como nos pacientes do grupo B, conforme demonstra a Tabela 9.

No grupo A, três pacientes (33%) apresentaram sorologias inconclusivas e hemocultura negativa. Estes três pacientes não realizaram o tratamento para a DC. Desses três, dois apresentaram resultado abaixo do limite de quantificação e um foi negativo. Os outros seis pacientes apresentaram sorologias positivas e hemoculturas negativas. Um apresentou qPCR negativa e cinco apresentaram resultados abaixo do limite de quantificação. Estes seis pacientes realizaram o tratamento com benznidazol.

No grupo B, quatro pacientes com sorologias positivas apresentaram hemoculturas positivas para o *T. cruzi*, mas apresentaram resultado pela qPCR abaixo do limite de quantificação. Um paciente apresentou sorologia não reagente (PCR convencional positiva – resultado externo), hemocultura negativa e resultado pela qPCR abaixo do limite de quantificação. Os demais onze pacientes apresentaram sorologias positivas e hemoculturas negativas, e três desses foram quantificados pela qPCR em 0,1 parasito/ml, enquanto outros oito apresentaram resultado abaixo do limite de quantificação. Nenhum paciente do grupo B realizou tratamento específico para a DC.

Grupo A				
Paciente	Sorologia	Hemocultura	Quantificação	Tratamento
MCBS	Reagente	Negativa	0,0021	Sim
VLC	Reagente	Negativa	Negativo	Sim
AMC	Duvidosa	Negativa	0,0018	Não
ICS	Duvidosa	Negativa	Negativo	Não
GLC	Reagente	Negativa	0,00085	Sim

ISL	Reagente	Negativa	0,01	Sim
JRO	Reagente	Negativa	0,0017	Sim
LDRB	Duvidosa	Negativa	0,0018	Não
SCSF	Reagente	Negativa	0,0051	Sim

TABELA 9: RESULTADOS DAS TÉCNICAS DE SOROLOGIA, HEMOCULTURA E qPCR, E O TRATAMENTO PARA DC DOS PACIENTES DO GRUPO A.

Grupo B				
Paciente	Sorologia	Hemocultura	Quantificação	Tratamento
TFGN	Reagente	Negativa	0,0030	Não
MGF	Reagente	Negativa	0,0003	Não
MFS	Reagente	Negativa	0,0017	Não
MFLA	Reagente	Negativa	0,0028	Não
MAB	Reagente	Positiva	0,0002	Não
MRA	Não reagente *	Negativa	0,0002	Não
NDC	Reagente	Negativa	0,0016	Não
SSSS	Reagente	Positiva	0,0003	Não
JASS	Reagente	Positiva	0,0176	Não
MCS	Reagente	Positiva	0,0005	Não
RLC	Reagente	Negativa	0,033	Não
JNGF	Reagente	Negativa	0,0067	Não
CAM	Reagente	Negativa	0,11	Não
NVA	Reagente	Negativa	0,134	Não
GS	Reagente	Negativa	0,117	Não

TABELA 10: RESULTADOS DAS TÉCNICAS DE SOROLOGIA, HEMOCULTURA E qPCR, E O TRATAMENTO PARA DC DOS PACIENTES DO GRUPO B.

4.4. Análise Estatística

O teste exato de Fischer foi utilizado para comparar variáveis categóricas entre os dois grupos estudados (Tabelas 11 e 12).

GÊNERO	Grupo		Total
	A	B	
	5	9	
Feminino	35.71	64.29	14
	55.56	60.00	
	4	6	
Masculino	40.00	60.00	10
	44.44	40.00	
Total	9	15	24
P-valor: 1.0000			

TABELA 11: ANÁLISE ESTATÍSTICA DA DIFERENÇA DE GÊNERO ENTRE OS GRUPOS A E B PELO TESTE EXATO DE FISCHER.

HEMOCULTURA	Grupo		Total
	A	B	
	9	11	
Negativa	45.00	55.00	14
	100.00	73.33	
	0	4	
Positiva	0.00	100.00	10

	0.00	26.67	
Total	9	15	24
P-valor: 0.2589			

TABELA 12: ANÁLISE ESTATÍSTICA DA DIFERENÇA DOS RESULTADOS DE HEMOCULTURA ENTRE OS GRUPOS A E B PELO TESTE EXATO DE FISCHER.

A análise das variáveis numéricas foi realizada pelo teste de Mann-Whitney (Tabelas 13 e 14).

Grupo	Variável	N	Média	Mediana	D.P.	Min	Max	P-valor
A	Idade	9	51.27	51.00	11.88	35.00	67.00	0.4925
	Quantificação	9	0.0026	0.0018	0.0032	0.0000	0.100	0.3398
B	Idade	15	54.27	51.00	12.53	24.00	73.00	
	Quantificação	15	0.0286	0.0028	0.0485	0.0003	0,1340	

TABELA 13: ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE IDADE E QUANTIFICAÇÃO PELA QPCR PELO TESTE DE MANN-WHITNEY. N: NÚMERO; D.P.: DESVIO PADRÃO; MIN.: MÍNIMO; MAX: MÁXIMO.

Hemocultura	Variável	N	Média	Mediana	D.P.	Min	Max	P-valor
Negativa	Quantificação	11	0.0373	0.0031	0.0544	0.0003	0.1340	0.1704
Positiva		4	0.0047	0.0005	0.0086	0.0003	0.0176	

TABELA 14: ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE HEMOCULTURA E QPCR PELO TESTE DE MANN-WHITNEY. N: NÚMERO; D.P.: DESVIO PADRÃO; MIN.: MÍNIMO; MAX: MÁXIMO.

Em todos os parâmetros analisados, o valor de p não apresentou significância estatística.

5. Discussão

No presente trabalho buscou-se analisar a parasitemia por *T. cruzi* em pacientes transplantados renais através das técnicas de hemocultura e PCR em tempo real. No grupo de pacientes transplantados, dos nove pacientes, nenhum apresentou hemocultura positiva. No grupo B, composto por 15 pacientes não transplantados, sem imunossupressão e não tratados para a DC, a hemocultura foi positiva em quatro das 15 amostras (26%).

Conforme relatado na literatura, a técnica de hemocultura apresenta variados índices de positividade (0% a 97,4%) (64). Entretanto, para obter índices maiores Chiari (101) e Luz (63), propuseram algumas alterações no protocolo, como remoção do plasma do sangue total antes da adição do meio de cultura, processamento imediato da amostra após a coleta e leitura da amostra por 120 dias após a coleta. Com essas alterações, os autores encontraram índices de 55,5% (22/40) e 79% (41/52) de positividade, respectivamente. No presente estudo foram utilizadas as modificações sugeridas por estes autores.

Alguns autores utilizaram a hemocultura em conjunto com outros métodos para detectar a reativação da DC em indivíduos imunossuprimidos, e os resultados encontrados também foram variados: Braz e colaboradores (2001) demonstraram que, de 38 pacientes transplantados ou HIV positivos, apenas dois tiveram hemoculturas positivas, enquanto 10 apresentaram xenodiagnósticos positivos (102). Em outra ocasião, Braz e colaboradores (2013) observaram que, das 70 amostras de pacientes transplantados cardíacos, apenas seis tiveram hemoculturas positivas, enquanto em nove os xenodiagnósticos foram positivos (103). Entretanto, em um paciente portador do vírus HIV que apresentou reativação da DC, a hemocultura foi positiva antes do tratamento específico para a DC e, após o tratamento, em duas coletas, os resultados foram negativos (104).

No presente estudo, era esperado encontrar hemoculturas positivas nos pacientes do grupo A, uma vez que a parasitemia em pacientes imunossuprimidos deveria ser mais intensa, o que não ocorreu. Dentre os nove pacientes transplantados, seis deles foram tratados com benznidazol e três apresentaram sorologia duvidosa, podendo não se tratar de pacientes chagásicos, com possibilidade de reações cruzadas com outras doenças, como leishmanioses. Como houve tratamento etiológico, pressupõe-se que este tenha sido eficaz em erradicar o parasito, curando a doença, ou, no mínimo, diminuindo a parasitemia a ponto de não conseguir resultado positivo na hemocultura. No grupo B, por conter pacientes chagásicos crônicos, possivelmente imunocompetentes e não tratados para a DC, a positividade da

hemocultura foi de 26% (4/15), ou seja, está de acordo com os achados da literatura, uma vez que esta varia de 0% a 97,4% (64). Não foi observada diferença estatística significativa entre os resultados de hemocultura dos grupos A e B ($p < 0,05$).

Em relação à técnica de qPCR, na metodologia na qual este estudo foi baseado (97), foi utilizado o sistema Taqman®, uma sonda que emite fluorescência após a atividade exonuclease 5' → 3' da *Taq* DNA polimerase (105); o alvo molecular foi o DNA satélite do *T. cruzi* e a extração de DNA foi realizada a partir do *buffy coat* obtido de amostra de sangue de 6 ml com o *Kit Comercial High Pure PCR Template Preparation* (Roche®). Em contrapartida ao estudo de referência (97), no qual encontraram linearidade nos pontos 10^5 a 10^1 da curva padrão, nesse estudo foi possível obter linearidade nos pontos 10^5 a 10^{-1} , o que ampliou o limite de quantificação das amostras.

Sabendo que o limite de quantificação da técnica foi 0,1 parasito/mL, apenas três amostras do grupo B foram quantificadas em 0,1 parasito/ml. Dois pacientes do grupo A não apresentaram sinal de fluorescência e foram considerados negativos. As demais amostras do grupo A e do grupo B apresentaram sinal de fluorescência, mas não foram quantificadas. Para os pacientes do grupo A, era esperado que apresentassem uma quantificação alta, uma vez que são imunossuprimidos, enquanto que no grupo B eram esperados resultados de baixa parasitemia, pois são pacientes chagásicos crônicos. Dos três pacientes do grupo A que apresentaram sorologia inconclusiva, um foi negativo para qPCR, o que pode ser interpretado como que o paciente não era portador da DC, e dois apresentaram sinal de fluorescência, mas sem quantificação, podendo significar que a parasitemia se apresentava muito baixa, apesar da imunossupressão. Tal comportamento da parasitemia em imunossuprimidos, sem tratamento específico para a DC, fica difícil ser interpretado, uma vez que ainda não foi descrito falsa positividade no diagnóstico molecular da DC.

Ao contrário do encontrado no presente estudo, Duffy *et al* (2009) (81) observaram parasitemia elevada em três pacientes transplantados cardíacos que sofreram reativação da DC, sendo que, em um paciente, houve redução da carga parasitária após a administração do tratamento específico com benznidazol. Provavelmente, essa diferença deve-se ao fato de as amostras de sangue de tal estudo terem sido misturadas com tampão guanidina-EDTA antes da extração de DNA, que foi realizada com *kit* comercial QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen®, Valencia, CA). A metodologia de qPCR foi realizada com o sistema SYBR Green, e o alvo molecular foi o DNA satélite do *T. cruzi*. A curva padrão foi realizada com os pontos 10^5 até 0,001 parasito/ml.

Utilizando três alvos moleculares (DNA satélite, kDNA e 18S rRNA) para a quantificação de *T. cruzi*, Qvarnstrom *et al* (2012) (82) analisaram sangue de 25 indivíduos imunossuprimidos, dos quais 16 foram positivos para pelo menos um alvo, e houve concordância dos resultados em 94% das amostras analisadas. Na metodologia descrita por Qvarnstrom *et al* (82), o DNA foi extraído de sangue e *buffy coat* através do kit QIAamp blood mini DNA kit (QIAGEN, Valencia, Calif.). As reações de qPCR para os três alvos foram realizadas com o sistema Taqman®, e o controle positivo da reação foi a cepa Y do *T. cruzi* em duas diferentes diluições.

Pacientes chagásicos co-infectados com o vírus HIV foram analisados no estudo de Freitas *et al* (2011) (106). Foram analisados 54 pacientes chagásicos crônicos e imunocompetentes, além de 34 co-infectados, dos quais cinco tiveram reativação da DC. Na reação de qPCR foi utilizada a metodologia SYBR Green e o alvo molecular foi a região microsatélite do *T. cruzi*, com os primers TCZ 3 e TCZ4. A curva padrão foi realizada com os pontos 10^5 a 10^{-3} parasitos/ml. O maior nível de parasitemia foi encontrado no grupo de pacientes que apresentaram reativação da DC, seguido pelos pacientes co-infectados que não apresentaram reativação e por último, os pacientes crônicos, demonstrando que pacientes que sofrem reativação da DC apresentam nível alto de parasitemia.

A utilização do sistema SYBR Green, citado anteriormente em dois trabalhos que quantificaram a parasitemia pelo *T. cruzi*, apresenta vantagens como baixo custo e facilidade no uso, entretanto, se liga a todo DNA dupla fita que surge durante a reação (incluindo dímeros dos *primers* e outros produtos inespecíficos), podendo superestimar a concentração do fragmento alvo. Em contrapartida, o sistema Taqman® é considerado sensível para detectar a presença ou ausência de sequências específicas (105).

Diversos estudos, clínicos e experimentais, utilizaram a técnica de qPCR para quantificar a parasitemia por *T. cruzi* (107–111). No que diz respeito ao protocolo para realização da técnica, tais estudos demonstraram grande variação em relação ao material biológico e tipo de extração de DNA, alvo molecular do parasito, controle interno da reação, elaboração da curva padrão e análise dos resultados. Com o objetivo de chegar a um consenso para a padronização de um protocolo, foi realizado um estudo internacional, com a participação de vários laboratórios, para comparar a eficácia da técnica em detectar e quantificar o parasito (83). O resultado desse estudo foi a apresentação de quatro técnicas moleculares que apresentaram melhores resultados, sendo duas qualitativas e duas quantitativas. O protocolo que foi seguido no presente estudo foi um dos que apresentaram

melhores resultados quantitativos, onde 16 de 18 amostras analisadas foram quantificadas (97).

Em relação aos três pacientes com resultados sorológicos inconclusivos do grupo A, a sorologia foi realizada antes do transplante. Portanto, não é possível dizer que estes resultados inconclusivos sejam devido à imunossupressão, o que poderia retardar a produção de anticorpos (27). Uma paciente do grupo B apresentou sorologia persistentemente não reagente, mas foi confirmada com a DC, pois, além de ter apresentado PCR convencional positiva, tem a forma digestiva da DC. Assim, como sugeriu Batista *et al* (2010) (76), muitos pacientes com megaesôfago chagásico apresentam sorologia negativa para a DC. Estudos vêm tentando analisar a concordância entre a sorologia e PCR para a DC (108,112), entretanto, há limitações em ambas as técnicas, podendo citar principalmente a diversidade genética do parasito e a ausência de padronização para realização na técnica molecular, resultando em diferentes níveis de sensibilidade.

As técnicas sorológicas e moleculares têm sido utilizadas também para analisar a eficácia do tratamento contra a DC. Aguiar *et al* (2012) (89) utilizaram três técnicas laboratoriais (hemocultura, sorologia – ELISA e IFI - e NPCR) para avaliar pacientes que realizaram o tratamento para a DC (n=29) e pacientes não tratados (n=10). Dos pacientes tratados, 29 foram positivos pela técnica de ELISA, 27 pela IFI, 14 positivos e três inconclusivos pela NPCR. Nenhum paciente deste grupo apresentou hemocultura positiva. No grupo de pacientes não tratados, 10 foram positivos pelo ELISA e pelo IFI, sete pela NPCR e quatro pela hemocultura. Os autores concluíram que, em alguns casos, houve falha terapêutica evidenciada pela NPCR, mas que, na maioria dos casos, o benznidazol foi capaz de diminuir a quantidade de parasitos na corrente sanguínea, o que foi demonstrado pelos resultados da hemocultura.

Machado-de-Assis *et al* analisaram 29 pacientes tratados e 29 não tratados. A sorologia foi reagente em todos os pacientes tratados e não tratados, enquanto a PCR foi positiva em 44,8% de pacientes tratados e 13,8% de pacientes não tratados. Os autores atribuíram estes resultados à parasitemia baixa e intermitente em pacientes com a fase crônica da DC. Estes dados demonstram que a PCR é mais fidedigna quanto à queda da parasitemia, considerando que os anticorpos evidenciados pela sorologia permanecem circulantes, mesmo após a evidência de cura terapêutica.

O tratamento específico é indicado formalmente em pacientes que sofrem reativação da DC, assim como para a fase aguda (27). Dos nove pacientes transplantados avaliados neste estudo, sete apresentaram o resultado pela qPCR abaixo do limite de quantificação, sendo que

seis realizaram o tratamento específico para a doença. Portanto, pode-se interpretar que não houve cura parasitológica, mas uma redução expressiva e mantida da parasitemia. A sorologia positiva para DC é compatível com essa interpretação. O resultado da qPCR, assim, pode auxiliar quanto à falha terapêutica, uma vez que a sorologia convencional pode levar muitos anos para demonstrar a redução dos títulos de anticorpos IgG ou negativar-se, nos casos em que o benznidazol tenha sido eficaz.

Em indivíduos submetidos ao transplante renal, os principais sintomas que sugerem reativação da DC são febre, fraqueza e lesões cutâneas eritematosas e doloridas (31,44,46,113). Os pacientes transplantados do presente estudo não apresentaram, até o momento, reativação da DC. No entanto, não se pode afirmar com certeza que o tratamento específico para a DC seja o responsável por este fato. Todavia, a baixa parasitemia demonstrada pelo exame de qPCR pode ter contribuído para este fato. Estudos afirmam que o tratamento com benznidazol resultou no controle da reativação da DC após transplante renal e cardíaco (31,114). Os pacientes foram transplantados em diferentes épocas (1996 a 2016), e, no paciente submetido ao transplante mais recentemente (2016), houve a administração do tratamento antes do transplante. No caso dos outros pacientes, todos foram transplantados há mais de um ano, e, portanto, a imunossupressão desses foi menos intensa (imunossupressão de manutenção), conforme é recomendado pelo Ministério da Saúde (95). Além disso, a reativação da DC em pacientes imunossuprimidos ocorre, geralmente, no primeiro ano após o transplante (43), e, o fato dos pacientes do grupo A terem sido transplantados há mais de um ano, e por seis deles terem sido tratados com benznidazol, pode ter resultado na redução da parasitemia.

A recomendação do Ministério da Saúde (95) para a imunossupressão de manutenção é a utilização da terapia tripla composta por prednisona, azatioprina, ciclosporina ou tacrolimo, podendo, em casos específicos, substituir um dos medicamentos por derivados do ácido micofenólico. Como não foram observados sinais clínicos ou laboratoriais de reativação da DC em nenhum paciente, não foi possível correlacionar a reativação com a droga imunossupressora utilizada, assim como o fez Bacal *et al* (2005) (96), que averiguou que a utilização de micofenolato de mofetila pode aumentar a reativação da DC em pacientes transplantados cardíacos.

Os testes sorológicos não detectam a reativação da DC, mas são utilizados como critério de cura, principalmente quando negativos. No presente estudo se mantiveram em titulação maior do que a considerada positiva, indicando, por este critério, que não houve cura sorológica no período de observação, após o tratamento específico.

A reativação da DC é uma preocupação constante em pacientes com a imunidade comprometida, decorrente do fato de o quadro clínico ser, por vezes, mais grave do que em pacientes com a infecção aguda primária, que, em muitos casos, chega a ser assintomática. O presente trabalho objetivou quantificar a carga parasitária em pacientes transplantados renais, para averiguar possível reativação da DC nesse grupo de pacientes. O objetivo inicial desta pesquisa era analisar a carga parasitária pelo *T. cruzi* através da qPCR antes e após o transplante, mas o número de pacientes encontrado foi pequeno, e oito deles já tinham sido submetidos ao transplante renal anteriormente ao período de realização do projeto. O fato de os pacientes terem sido transplantados há mais de um ano da coleta para realização do exame, em conjunto com a imunossupressão de manutenção, e, principalmente o fato de seis dos nove pacientes terem sido tratados para a DC podem justificar a baixa carga parasitária encontrada. No grupo de chagásicos crônicos e sem imunossupressão, a carga parasitária também ficou abaixo do limite de quantificação pela qPCR. No entanto, quatro de quinze apresentaram hemocultura positiva pelo *T. cruzi*. Não obstante, a diferença entre os resultados da hemocultura e da qPCR não apresentaram significância estatística ($p < 0,05$).

Diante dos resultados apresentados, a técnica de qPCR demonstrou ser uma técnica eficaz para detectar a presença do DNA de *T. cruzi* em sete de nove pacientes transplantados renais, mesmo em quantidades muito pequenas, demonstrando maior sensibilidade do que a hemocultura. Dessa forma, em pacientes transplantados, a qPCR poderá ser utilizada na monitorização da parasitemia pelo *T. cruzi*, com o objetivo de detectar precocemente sua elevação, e, assim, possibilitar condutas no sentido de evitar maiores complicações em consequência da reativação da DC. O presente estudo demonstrou, também, que a monitorização da parasitemia pela qPCR nestes pacientes deverá ocorrer independentemente de ter havido ou não tratamento específico para o *T. cruzi*.

6. Conclusões

- Foi possível quantificar a carga parasitária por *T. cruzi* em três pacientes não transplantados. Com exceção de dois pacientes transplantados em que não foi detectado o DNA do parasito, nos demais pacientes, transplantados ou não, detectou-se a presença de DNA do parasito em menor quantidade que o limite de quantificação da técnica;
- A qPCR apresentou maior sensibilidade do que a hemocultura no diagnóstico da DC em pacientes transplantados e não transplantados;
- Não foi encontrada relação entre a utilização de medicamentos imunossupressores e a carga parasitária por *T. cruzi* nos pacientes transplantados;
- A baixa carga parasitária observada pela qPCR e a ausência de parasitemia evidenciada pela hemocultura encontradas no grupo de pacientes transplantados (imunossuprimidos) sugerem que o tratamento específico com benznidazol possa ter alguma relação com estes resultados.

7. Referências Bibliográficas

1. Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;159–218.
2. Chagas C. Nova entidade morbida do homem. [cited 2017 Aug 3]; Available from: [http://www.scielo.br/pdf/mioc/v3n2/tomo03\(f2\)_219-275.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v3n2/tomo03(f2)_219-275.pdf)
3. PAHO. Chagas Disease [Internet]. Key facts. 2017. Available from: www.paho.org/chagasdisease
4. Dias JCP, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2008 Apr [cited 2017 Aug 23];41(2):193–6. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v41n2/20071100.pdf>
5. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. 2015 [cited 2017 Nov 13];46(21). Available from: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020..pdf>
6. WHO. Chagas disease : control and elimination. In: Sixty-Third World Health Assembly. 2010. p. 4.
7. Albajar-Viñas P, Jannin J. The hidden Chagas disease burden in Europe. Euro Surveill [Internet]. 2011 [cited 2017 Aug 22];16(38). Available from: www.eurosurveillance.org:pii=19975.
8. Soediono B. Controle da doença de Chagas nos países do Conesul da América. J Chem Inf Model. 2002;53:160.
9. Pinto AYN, Valente SA, Valente VC, Ferreira Junior AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2008 Dec [cited 2017 Aug 23];41(6):602–14. Available from: http://www.baip.ufpa.br/arquivos_baip/publicacoes/artigo_7.pdf
10. Costa EG, Santos SO, Sojo-Milano M, Amador ECC, Tatto E, Souza DSM, et al. Acute Chagas Disease in the Brazilian Amazon: Epidemiological and clinical features. Intern J Card [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 22];235:176–8. Available from: http://ac.els-cdn.com/S0167527317311312/1-s2.0-S0167527317311312-main.pdf?_tid=9ed64f86-8758-11e7-89a3-00000aabc35d&acdnat=1503420216_487241835d96e0fdc015cc48bfb7220b

11. Corassa RB, Aceijas C, Alves PAB, Garelick H. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. *Perspect Public Health* [Internet]. 2016 [cited 2017 Aug 22];XX. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1757913916671160>
12. Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Intern J Syst Evol Microb*. 2004;54:1861–75.
13. Degraive W, Fragoso SP, Britto C, Van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MAB, et al. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1988 [cited 2017 Sep 26];27:63–70. Available from: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/14598/2/carlos9_morel_et_al_IOC_1988.pdf
14. Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution. *Rev Microbiol* [Internet]. 1987 [cited 2017 Aug 29];41:363–62. Available from: [http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/Lab publications/Scanned/The mitochondiral Genome of.pdf](http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/Lab%20publications/Scanned/The%20mitochondrial%20Genome%20of.pdf)
15. Sturm NR., Degraive W., Morel C., Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1989 [cited 2017 Aug 29];33:205–14. Available from: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/14600/2/carlos11_morel_et_al_IOC_1989.pdf
16. Martins AV, Gomes AP, Mendonça EG, Fietto JLR, Santana LA, Oliveira MGA, et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*. 2012;16(1):45–58.
17. Fiocruz. Exposição Carlos Chagas Virtual [Internet]. 2009 [cited 2017 Oct 16]. Available from: <http://www.invivo.fiocruz.br/chagas/pginicial.html>
18. Dias JCPi, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem para o clínico geral. Rio Janeiro Ed FIOCRUZ [Internet]. 1997 [cited 2017 Aug 2];486 p. Available from: <http://static.scielo.org/scielobooks/nf9bn/pdf/dias-9788575412435.pdf>
19. Zingales B, Andrade S, Briones M, Campbell D, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro*. 2009;104(7):1051–4.
20. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* [Internet]. 1998 [cited 2017 Oct

- 3];28:85–104. Available from: https://ac.els-cdn.com/S002075199700180X/1-s2.0-S002075199700180X-main.pdf?_tid=2042fb88-a89b-11e7-854d-00000aab0f02&acdnat=1507077167_5927072f74d5393c6465b82690410d72
21. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012;12:240–53.
 22. Junqueira AV, Gonçalves CM, Moreira CC. Curso de capacitação dos microscopistas de malária e dos laboratoristas da rede pública na detecção do *Trypanosoma cruzi*, Modulo III. Curso Capacit dos Microsc malária e dos Lab da rede pública na detecção do Trypanos cruzi. 2006;
 23. Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas Jr VD, et al. Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas). Instituto Oswaldo Cruz. 2014;58.
 24. Roque ALR., Jansen AM. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. Zool guias e manuais identificação [Internet]. 2014 [cited 2017 Aug 28];75–87. Available from: <http://books.scielo.org/id/mw58j/pdf/galvao-9788598203096-07.pdf>
 25. CDC. American Trypanosomiasis [Internet]. Atlanta: World Health Organization; 2013. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>
 26. Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions -A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro* [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 12];110(3):277–82. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v110n3/0074-0276-mioc-0074-0276140362.pdf>
 27. Ministério da Saúde. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015* Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015 Antônio Carlos Silveira (in memoriam) Joffre Marcondes de Rezende (in memoriam). *Epidemiol Serv Saúde*, Brasília. 2016;25:7–86.
 28. WHO. Control of Chagas disease [Internet]. Geneva; 2002 [cited 2017 Jun 7]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42443/1/WHO_TRS_905.pdf
 29. Cicora F, Ecurra V, Silguero S, González IM, Roberti JE. Use of Kidneys From *Trypanosoma Cruzi*-Infected Donors in Naive Transplant Recipients Without Prophylactic Therapy. *Transplant J* [Internet]. 2014;97(1):e3–4. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00007890-201401150-00021>

30. Márquez E, Crespo M, Mir M, Pérez-Sáez MJ, Quintana S, Barbosa F, et al. Chagas' disease and kidney donation. *Nefrología* [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 12];33(1):128–33. Available from: <http://www.revistanefrologia.com>
31. Riarte A, Luna C, Sabatiello R, Sinagra A, Schiavelli R, Rissio A, et al. Chagas' Disease in Patients with Kidney Transplants: 7 Years of Experience. *Clin Infect Dis*. 1999;29:561–7.
32. Kun H, Moore A, Mascola L, Steurer F, Lawrence G, Kubak B, et al. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009;48(11):1534–40. Available from: <http://cid.oxfordjournals.org/content/48/11/1534.long>
33. Barcán L, Luna C, Lunaó C, Clara L, Sinagra A, Valledor A, et al. Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. *Liver Transpl* [Internet]. 2005;11(9):1112–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123968>
34. Altclas J, Sinagra A, Dictar M, Luna C, Verón MT, Rissio AM, et al. Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2005;36(2):123–9. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.bmt.1705006>
35. Dias JCP, Amato Neto V, Luna EJ de A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Rev da Soc Bras Med Trop* 44(3)375-379,. 2011;44(3):375–9.
36. Perez CJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. *Trends Parasitol* [Internet]. 2015 Nov [cited 2016 May 3];31(11):595–603. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492215001439>
37. Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 2006 [cited 2017 Sep 17];100(6):1–15. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.667.2564&rep=rep1&type=pdf>
38. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *LANCET Infect Dis*. 2001;1:92–100.
39. Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. Chagas Heart Disease: An Update. *Am J Med* [Internet]. 2015 [cited 2017 Oct 24];128:1251.e7–1251.e9. Available from:

- https://ac.els-cdn.com/S0002934315004477/1-s2.0-S0002934315004477-main.pdf?_tid=a581df10-b8d8-11e7-bcd5-00000aacb35e&acdnat=1508862809_733b71f22249729ecdd08cca4a256433
40. Rassi A, Marcondes De Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infect Dis Clin NA [Internet]. 2012 [cited 2017 Oct 24];26:275–91. Available from: https://ac.els-cdn.com/S0891552012000116/1-s2.0-S0891552012000116-main.pdf?_tid=6c94ccaa-b8db-11e7-89bd-00000aacb361&acdnat=1508864002_6d8aa8ec094a824d0bdcc75e973020a0
 41. Barbosa Marcon GE, Martins De Albuquerque D, Batista AM, Andrade PD, Almeida EA, Guariento ME, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro [Internet]. 2011 [cited 2017 Jul 25];106(1):85–91. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v106n1/14.pdf>
 42. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, Reis D d'Ávila, Macedo AM, Adad SJ, et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease differential distribution of genetic types into diverse Oogans. Amer J Pathol [Internet]. 2000 [cited 2017 Jul 27];156(5):1805–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1876933/pdf/2156.pdf>
 43. Bacal F, Silva CP, Pires PV, Mangini S, Fiorelli AI, Stolf NG, et al. Transplantation for Chagas' disease: An overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. Clin Transplant. 2010;24(2):29–34.
 44. Gallerano V, Consigli J, Pereyra S, Zanni SG, Danielo C, Gallerano RH, et al. Chagas' disease reactivation with skin symptoms in a patient with kidney transplant. Int J Dermatol. 2007;46(6):607–10.
 45. Riganti J, Maqueda MG, Bazta C, Volonteri VI, Galimberti RL. Tropical medicine rounds Reactivation of Chagas ' disease : cutaneous manifestations in two immunosuppressed patients. Int J Dermatol. 2012;51:829–34.
 46. Kocher C, Segerer S, Schleich A, Caduff R, Wyler LG, Müller V, et al. Skin lesions, malaise, and heart failure in a renal transplant recipient. Transpl Infect Dis. 2012;14(4):391–7.
 47. Menghi C, Gatta C, Arcavi M. *Trypanosoma cruzi* en el líquido cefalorraquídeo de un paciente com SIDA. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2010 [cited 2017 Oct 26];42:142. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v42n2/v42n2a17.pdf>
 48. Fica, A.; Salinas, M., Jercic, M. I.; Dabanch, J.; Soto, A.; Quintadilla, S.; Flores C. Enfermedad de Chagas del sistema nervioso central en un paciente con SIDA

- demonstrada por métodos cuantitativos moleculares Chagas disease affecting the central nervous system in a patient with AIDS demonstrated by quantitative molecular methods. *Rev Chil Infectol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Sep 11];34(1):69–76. Available from: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v34n1/art11.pdf>
49. Verdú J, Paz F, Castaño V, Torrús D, Reus S. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement : peripheral blood smear evidence. *Int J Infect Dis*. 2009;13:527–8.
 50. Cordova E, Boschi A, Ambrosioni J, Cudos C, Corti M, Muñiz FJ, et al. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992—2007. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2008 [cited 2017 Oct 26];12:587–92. Available from: <http://intl.elsevierhealth.com/journals/ijid>
 51. Almeida EA, Lima JN, Lages-Silva E, Guariento ME, Aoki FH, Torres-Morales AE, et al. Chagas disease and HIV co-infection in patients without effective antiretroviral therapy: prevalence, clinical presentation and natural history. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104:447–52.
 52. Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(3):592–630.
 53. Dutra WO, Menezes CAS, Magalhães LMD, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2017 Oct 27];36(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4143493/pdf/nihms571915.pdf>
 54. Vallejo A, Na Monge-Maillo B, Gutiérrez C, Norman FF, López-Vélez R, Pérez-Molina JA. Changes in the immune response after treatment with benznidazole versus no treatment in patients with chronic indeterminate Chagas disease. *Acta Trop* [Internet]. 2016 [cited 2017 Oct 27];164:117–24. Available from: https://ac.els-cdn.com/S0001706X16303345/1-s2.0-S0001706X16303345-main.pdf?_tid=1a948d5e-bb16-11e7-b54e-00000aabb0f01&acdnat=1509109107_4ce4441aa7e11e356f2736bbc45fc108
 55. Tarleton RL. Chagas idisease: a solvable problem, ignored. *Trends Mol Med*. 2016;xx:1–4.
 56. Strout RG. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol*. 1962;48:100.
 57. Abegg CP, Abreu AP, Silva JL, Araújo SM, Gomes ML, Ferreira EC, et al. Polymorphisms of blood forms and in vitro metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. *Exp Parasitol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 16];176:8–15. Available

from: https://ac.els-cdn.com/S0014489417300851/1-s2.0-S0014489417300851-main.pdf?_tid=bc613ca8-b2c5-11e7-837f-00000aabb0f6c&acdnat=1508194980_f52d28558f7bc2d403f85bdfa0e47516

58. Schenone H. Xenodiagnosis. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro [Internet]. 1999 [cited 2017 Jun 2];289 Suppl.:289–94. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v94s1/4200.pdf>
59. Camargo E. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1964;6(3):93–100.
60. Chiari E, Dias JCP. Nota sobre uma nova técnica de hemocultura para diagnóstico parasitológico na doença de Chagas na sua fase crônica. Rev Soc Bras Med Trop. 1975;IX(3):133–6.
61. Mourão O, Chiari E. Comprovação parasitológica na fase crônica da doença de Chagas por hemoculturas seriadas em meio “LIT.” Rev Soc Bras Med Trop. 1975;IX(5):215–9.
62. Luz ZM, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1994;27(3):143–8.
63. Luz ZMP. Changes in the Hemoculture Methodology Improve the Test Positivity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(SUPPL. 1):295–8.
64. Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas’ disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. Rev Saúde Pública [Internet]. 2003;37(1):107–15. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med4&NEWS=N&AN=12488927>
65. Brener Z, Chiari E. Aspects of Early Growth of Different *Trypanosoma cruzi* Strains in Culture Medium. Source J Parasitol J Parasitol [Internet]. 1965 [cited 2016 Jun 8];51(6):922–6. Available from: <http://www.jstor.org/stable/3275869>
66. WHO. Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests. In Geneva; 2007 [cited 2017 Oct 2]. Available from: http://www.who.int/bloodproducts/ref_materials/WHO_Report_1st_Chagas_BRP_consultation_7-2007_final.pdf
67. Ferreira AW, Belem ZR, Lemos EA, Reed SG, Campos-neto A, Paulo A-S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of Chagas’ Disease Employing a *Trypanosoma cruzi* Recombinant Antigen That Consists of Four Different

- Peptides. J Clin Microbiol [Internet]. 2001 [cited 2018 Jan 31];39(12):4390–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88554/pdf/jm1201004390.pdf>
68. Carli G. Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas [Internet]. São Paulo: Atheneu. 2001. p. 879. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Parasitologia+Cl?nic a#1>
 69. SVS. Informe técnico e recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. Rev Patol Trop [Internet]. 2013 [cited 2017 Aug 31];42(4):475–8. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/>
 70. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science (80-) [Internet]. 1988;239:487–91. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2448875>
 71. Elias MCQB, Vargas NS, Zingales B, Schenkman S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 2003;129(1):1–9.
 72. Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, Paiva E DE, Degraeve W, Morel CM, et al. 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 [Internet]. 1993 [cited 2017 Sep 10];31(9):2421–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265772/pdf/jcm00021-0187.pdf>
 73. Britto C, Cardoso MA, Vanni CMM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. Parasitology [Internet]. 1995;110(03):241. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182000080823
 74. Gilbet SR, Alban SM, Gobor L, Bescrovaine JO, Myiazaki MI, Thomaz-Soccol V. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(3):310–5.
 75. Marcon G, Andrade P, Albuquerque D, Wanderley J, Almeida E, Guariento M, et al. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. [cited 2017 Sep 11]; Available from: <http://ac.els-cdn.com/S0732889302003668/1->

s2.0-S0732889302003668-main.pdf?_tid=c89de802-970b-11e7-a890-00000aab0f27&acdnt=1505146448_7a896c29b7eb0e332dc3d11462187fbb

76. Batista AM, Aguiar C, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, Costa SCB. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. *Intern J Infect Dis* [Internet]. 2010 [cited 2017 Jun 7];14:974–7. Available from: [http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(10\)02439-2/pdf](http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(10)02439-2/pdf)
77. Moser DR, Kirchhoff L V, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*. 1989;27(7):1477–82.
78. Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1991 [cited 2017 Sep 26];48(211). Available from: [http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/Lab publications/86.pdf](http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/Lab%20publications/86.pdf)
79. Caldas S, Caldas IS, Diniz LF, Lima WG, Oliveira RP, Cecílio AB, et al. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop* [Internet]. 2012;123(3):170–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.05.002>
80. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends Mol Med*. 2002;8(6):257–60.
81. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(4):1–10.
82. Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(7):1–8.
83. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. 2011;5(1):1–13.
84. Ferreira MS, Borges AS. Some Aspects of Protozoan Infections in Immunocompromised Patients: A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(4):443–57.
85. Arias LF, Duque E, Ocampo C, Henao J, Zuluaga G, Varela G, et al. Detection of

- Amastigotes of *Trypanosoma Cruzi* in a Kidney Graft With Acute Dysfunction. *Transplant Proc.* 2006;38(3):885–7.
86. Oliveira M, Nagao-Dias A, Pontes V, Souza Jr A, Coelho H, Coelho I. Tratamento Etiológico Da Doença De Chagas No Brasil. *Rev Patol Trop* [Internet]. 2008;37(3):209–28. Available from: http://www.ufg.br/this2/uploads/files/62/2008_37_3_209_228.pdf
 87. Pinazo MJ, Muñoz J, Posada E, López-Chejade P, Gállego M, Ayala E, et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4896–9.
 88. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 17];1–15. Available from: www.elsevier.com/locate/actatropica
 89. Aguiar C, Batista AM, Pavan TBS, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, et al. Serological profiles and evaluation of parasitaemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benzonidazole. *Trop Med Int Heal.* 2012;17(3):368–73.
 90. Machado-de-Assis GF, Diniz GA, Montoya RA, Dias JCP, Coura JR, Machado-Coelho GLL, et al. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(7):873–80.
 91. Câmara dos Deputados. Legislação brasileira sobre doação de órgãos humanos. Brasil; 2002 p. 123.
 92. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2009-2016). Registro Brasileiro de Transplantes [Internet]. 2016; Available from: www.abto.org.br
 93. Medina-Pestana JO, Galante NZ, Tedesco-Silva Jr H, Harada KM, Garcia VD, Abbud-Filho M, et al. O contexto do transplante renal no Brasil e sua disparidade geográfica. *J Bras Nefrol.* 2011;33(4):472–84.
 94. Manfro RC, Carvalhal GF. Transplante renal. *Rev AMRIGS.* 2003;015(1):14–9.
 95. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: imunossupressão no transplante renal. Brasil; 2014.

96. Bacal F, Silva CP, Bocchi EA, Pires PV, Moreira LFP, Issa VS, et al. Mycophenolate mofetil increased Chagas disease reactivation in heart transplanted patients: Comparison between two different protocols. *Am J Transplant*. 2005;5(8):2017–21.
97. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007;103:195–200.
98. Batista AM. Detecção e quantificação de dna de *Trypanosoma cruzi* em portadores de megaesôfago [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2014.
99. Validation of Analytical Procedures: text and methodology [Internet]. ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005 [cited 2017 Oct 3]. Available from: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
100. MAPA. Manual de verificação de desempenho de métodos para diagnóstico molecular de doenças infecciosas na rede nacional de laboratórios agropecuários [Internet]. Brasília; 2015. Available from: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/biomol_final_baixa.pdf
101. Chiari E, Dias JC, Lana M, Chiari C a. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 1989;22(1):19–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2517801>
102. Braz LMA, Amato Neto V, Carignani FL, De Marchi CR. *Trypanosoma cruzi* parasitemia observed in immunocompromised patients: The importance of the artificial xenodiagnosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001;43(2):113–5.
103. Braz LMA, Dias SKM, Gakiya E, Bezerra RC, Cruz FDD, Ayub-Ferreira SM, et al. Análise de técnicas parasitológicas utilizadas no seguimento de pacientes com doença de Chagas e tratados por meio do transplante cardíaco. *Rev Patol Trop* [Internet]. 2013;42(1):56–63. Available from: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/23594>
104. Sartori A, Caiaff-Filho H, Bezerra R, Guilherme C, Lopes M, Shikanai-Yasuda MA. Exacerbation of HIV viral load simultaneous with asymptomatic reactivation of chronic Chagas's disease. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2002 [cited 2017 Oct 9];67(5):521–3. Available from: <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/67/5/12479555.pdf?expires=1507558414&id=id&accname=guest&checksum=96896784F8C5D0DF4CC3ABE892574BAD>

105. Novais CM, Pires-alves M. PCR em Tempo Real. *Biotechnol Ciência Desenvolv.* 2004;33:10–3.
106. Freitas V, Silva S, Sartori A, Bezerra R, Westphalen E, Molina T, et al. Real-Time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* Coinfection with and without Chagas Disease Reactivation: Association with HIV Viral Load and CD4. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2011 [cited 2017 Aug 21];5(8):1–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3166046/pdf/pntd.0001277.pdf>
107. Ramírez JC, Cura CI, Moreira OC, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn* [Internet]. 2016 [cited 2017 Aug 21];17(5):605–15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4698797/pdf/nihms729152.pdf>
108. Melo MF, Moreira OC, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Oliveira Júnior W, et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors* [Internet]. 2011 [cited 2017 Mar 19];8:154:1–7. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4369093/pdf/13071_2015_Article_770.pdf
109. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1).
110. Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;129(1):53–9.
111. Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MFAD, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.* 2013;125(1):23–31.
112. Brasil PE, Castro L, Hasslocher-Moreno A, Sangenis L, Braga J. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2010 [cited 2017 Jun 7];10:337:1–17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3004908/pdf/1471-2334-10-337.pdf>
113. Campos FP, Pansard HM, Arantes L, Rodrigues A, Daubermann M, Azambuja M, et al. A case of Chagas' disease panniculitis after kidney transplantation Paniculite chagásica pós-transplante renal: relato de caso. *J Bras Nefrol*2 [Internet]. 2016 [cited 2017 May 29];38(1):127–31. Available from:

http://www.scielo.br/pdf/jbn/v38n1/en_0101-2800-jbn-38-01-0127.pdf

114. Costales JA, Kotton CN, Zurita-Leal AC, Garcia-Perez J, Llewellyn MS, Messenger LA, et al. Chagas disease reactivation in a heart transplant patient infected by domestic *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I (TcI DOM). Parasit Vectors [Internet]. 2015 [cited 2017 Jul 20];8:435:1–6. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4548706/pdf/13071_2015_Article_1039.pdf

8. Anexos

Anexo I: Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp

Plataforma Brasil

http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/vista/pe/pesquisador/...

principal x sair

Juliana de Jesus Guimarães Ferreira - Pesquisador | V3.0
sua sessão expira em: 35min 12

Cadastros

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Quantificação do Trypanosoma cruzi pela qPCR em transplantes renais seguidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP
Pesquisador Responsável: Juliana de Jesus Guimarães Ferreira
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 45940515.5.0000.5404
Submetido em: 16/08/2015
Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Recepção PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_522937

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações
Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 3				
Projeto Original (PO) - Versão 3				
Documentos do Projeto				
Declaração de Manuseio Material Biológico				
Folha de Rosto - Submissão 1				
Informações Básicas do Projeto - Subm				
Interface REBEC - Submissão 1				
Outros - Submissão 1				
Projeto Detalhado / Brochura Investigac				
TCE / Termos de Assentimento / Justif				
Apreciação 1 - Comitê de Ética em Pesqui				
Projeto Completo				

LISTA DE APEÇAÇÕES DO PROJETO

Apreciação	Pesquisador Responsável	Versão	Submissão	Modificação	Situação	Exclusiva do Centro Coord.	Ações
PQ	Juliana de Jesus Guimarães Ferreira	3	16/08/2015	03/09/2015	Aprovado	Não	

HISTÓRICO DE TRÂMITES

Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informações
PQ	03/09/2015 12:50:47	Parecer liberado	3	Coordenador	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	PESQUISADOR	
PQ	03/09/2015 12:48:10	Parecer do colegiado emitido	3	Coordenador	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	
PQ	03/09/2015 12:31:17	Parecer do relator emitido	3	Coordenador	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	
PQ	21/08/2015 10:51:15	Aceitação de Elaboração de Relatório	3	Coordenador	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	
PQ	18/08/2015 19:41:00	Confirmação de indicação de Relatório	3	Coordenador	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	
PQ	17/08/2015 18:44:01	Indicação de Relatório			Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas		
PQ	17/08/2015 18:44:42	Aceitação do PR			Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	
PQ	16/08/2015 20:25:32	Submetido para avaliação do CEP		Pesquisador Principal	PESQUISADOR RESPONSÁVEL	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	

Ocorrência 1 a 10 de 28 registro(s)

1 de 2

03/09/2015 10:2

	Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informações
	PQ	14/08/2015 14:04:21	Parecer liberado			Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	
	PQ	14/08/2015 13:00:29	Parecer do Colegiado Editado			Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	

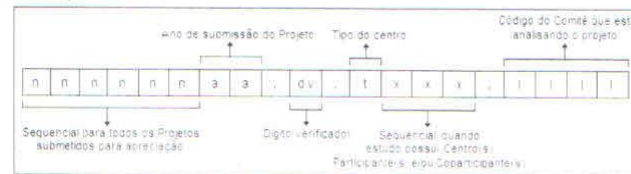
« « Ocorrência 1 a 10 de 28 registro(s) » »

LEGENDA:

(F) Apreciação

PQ = Projeto Original de Centro Coordenador	PQc = Projeto Original de Centro Participante	PQc = Projeto Original de Centro Coparticipante
E = Emenda de Centro Coordenador	Ec = Emenda de Centro Participante	Ec = Emenda de Centro Coparticipante
N = Notificação de Centro Coordenador	Np = Notificação de Centro Participante	

(F) Formação do CAAE

[Voltar](#)

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior),
ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado por todos os pacientes.

Termo De Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: "Quantificação da parasitemia pelo *Trypanosoma cruzi*: utilização da qPCR em transplantados renais com doença de Chagas seguidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP"

Responsável: Juliana de Jesus Guimarães Ferreira

Número do CAAE: 45940515.5.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Para participar do estudo serão coletados de 20 a 30 mL de sangue por profissionais qualificados do centro de coleta do Hospital de Clínicas, no mesmo dia da consulta de acompanhamento previamente agendada pelo Grupo de estudos em doença de Chagas (GedoCh) ou pelo ambulatório de Nefrologia/HC/UNICAMP. Há riscos mínimos na coleta de sangue sendo, o evento mais desagradável, a dor relacionada à punção venosa e manchas roxas freqüentes no local da punção. Há outras complicações que, embora raras, podem ocorrer: tromboflebite superficial (infecção superficial da veia causada por coágulo), celulites (infecção das camadas mais profundas da pele), punção do nervo periférico, punção inadvertida da artéria com possível pseudoaneurisma (hematoma na parede arterial) ou trombose local dentre outros. O material biológico obtido será processado e devidamente armazenado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular até o final do estudo, caso seja necessário repetir o exame. Caso haja necessidade de utilização do material em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, fica a seu critério escolher uma das opções abaixo:

☐ concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

☐ concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

Espera-se que, a partir dos resultados obtidos, seja possível estabelecer uma relação entre a quantidade de parasitas em pacientes transplantados renais e o esquema de imunossupressão e o tratamento da doença de Chagas; portanto, esse estudo não lhe trará benefícios diretos e imediatos. As informações obtidas serão confidenciais e quaisquer dados serão divulgados de forma que não possibilite sua identificação, assegurando total privacidade. Não haverá nenhuma forma de reembolso em dinheiro, já que sua participação não lhe trará nenhum gasto. O pesquisador responsável pela pesquisa (identificado abaixo) lhe apresentará

Página 1 de 2

o termo e, estando de acordo com o presente documento, você assinará duas vias de igual conteúdo e forma, ficando uma em sua posse.

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, através dos meios citados abaixo:

Endereço profissional: Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular, localizado na Rua Alexander Fleming, prédio FCM 09, Departamento de Clínica Médica, sala 03. Faculdade de Ciências Médica, UNICAMP.

Email: julianaigf@ig.com.br

Telefone: 19-35217096

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 13:30hs e das 13:00hs às 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido:

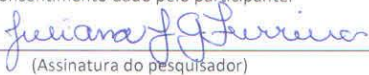
Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: _____

_____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu responsável LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

 _____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do pesquisador)