



ANGELICA MARTINS BATISTA

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE TRYPANOSOMA
CRUZI EM PORTADORES DE MEGAESÔFAGO

CAMPINAS
2014



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

ANGELICA MARTINS BATISTA

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE TRYPANOSOMA CRUZI EM
PORTADORES DE MEGAESÔFAGO

ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA
CO-ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. EROS ANTONIO DE ALMEIDA

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica na área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
ANGELICA MARTINS BATISTA, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B32d Batista, Angelica Martins, 1983-
Detecção e quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* em portadores de megaesôfago / Angelica Martins Batista. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Doença de Chagas. 2. Acalasia esofágica. 3. Técnicas de diagnóstico molecular. 4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. I. Costa, Sandra Cecília Botelho, 1951-. II. Almeida, Eros Antonio de, 1951-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Detection and quantitation of *Trypanosoma cruzi* DNA in patients with megaesophagus

Palavras-chave em inglês:

Chagas disease

Esophageal achalasia

Molecular diagnostic techniques

Real time polymerase chain reaction

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Sandra Cecília Botelho Costa [Orientador]

André Fattori

Luiz Roberto Lopes

Maria Aparecida Barone Teixeira

Cristina Brandt Friedrich Martin Gurgel

Data de defesa: 31-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ANGELICA MARTINS BATISTA

ORIENTADORA: PROF. DR. SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA

COORIENTADOR: PROF. DR. EROS ANTONIO DE ALMEIDA

MEMBROS:

1. PROF. DR. SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA Sandra Costa

2. PROF. DR. ANDRÉ FATTORI André Fatori

3. PROF. DR. LUIZ ROBERTO LOPES Luiz Roberto Lopes

4. PROF. DR. MARIA APARECIDA BARONE TEIXEIRA M. Barone

5. PROF. DR. CRISTINA BRANDT FRIEDRICH MARTIN GURGEL Cristina Friedrich Gurgel

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

Data: 31 de janeiro de 2014

Aos meus pais, Eliseu e Milts,
com carinho

AGRADECIMENTOS

À Dra. Sandra, por ter me dado oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa e incentivar a continuidade do trabalho de mestrado.

Ao Dr. Eros, pelas sugestões e por estar sempre disposto a ouvir minhas inquietações.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

À equipe do GEDoCh/UNICAMP, em especial à Dra. Maria Elena, Dr. Jamiro e Irene, pelo apoio.

À equipe do laboratório de Patologia Clínica e Dr. Levy, por gentilmente terem cedido espaço para nossas amostras.

À amiga Camila, companheira de congressos, com quem dividi momentos de crise e também muitas alegrias.

À Tycha, pela ajuda com os ensaios de hemocultura e seu humor único.

Aos colegas de laboratório: Emanuel, Fernanda, Jamile, Josiele, Juliana, Mariane, Paula, Renata e Rodrigo, por compartilharmos a paixão pela pesquisa e as delícias e dores da vida acadêmica.

Às amigas Andréia e Natália, pela amizade que resiste ao tempo e à distância.

Aos meus sogros e cunhadas, pelos momentos de descontração e palavras de incentivo.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo estímulo e apoio incondicional em todos os momentos.

Ao Luiz Gustavo, pela paciência, otimismo e compreensão.

“Our passion for learning... is our tool for survival”

RESUMO

Atualmente, o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas crônica baseia-se em métodos sorológicos convencionais. Entretanto, resultados falso-negativos e falso-positivos podem ocorrer. A hemocultura também pode ser utilizada como método diagnóstico, mas sua sensibilidade é limitada devido à parasitemia baixa e intermitente na fase crônica. Métodos diagnósticos baseados em princípios de biologia molecular vêm sendo estudados e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido a técnica mais utilizada ultimamente. Este estudo teve como objetivo principal avaliar o desempenho da PCR qualitativa e quantitativa no diagnóstico da doença de Chagas em pacientes portadores de megaesôfago. Foram estudadas amostras de DNA de sangue de 26 pacientes com sorologia não reagente ou inconclusiva e de 33 pacientes soropositivos para doença de Chagas. O alvo genético mais adequado para PCR qualitativa, que apresentou maior positividade, foi o Sat-DNA de *T. cruzi*. Quando comparada com os resultados de PCR quantitativa, houve concordância de 72,72% em ambos os grupos. Além disso, observou-se que todos os pacientes com hemocultura positiva apresentaram PCR qualitativa positiva. A metodologia quantitativa, embora considerada altamente sensível, não detectou DNA de *T. cruzi* em uma amostra de paciente com hemocultura positiva. Nossos resultados indicam um possível subdiagnóstico da doença de Chagas em pacientes com megaesôfago devido aos exames sorológicos negativos ou inconclusivos. A PCR qualitativa mostra-se uma ferramenta útil para esclarecimento da etiologia do megaesôfago e, por apresentar positividade semelhante à qPCR, não se justifica o uso de metodologia quantitativa para fins exclusivamente diagnósticos.

Palavras-chave: doença de Chagas, acalasia esofágica, técnicas de diagnóstico molecular, reação em cadeia da polimerase em tempo real

ABSTRACT

Current laboratory diagnosis of chronic Chagas disease relies on conventional serological tests but false-positive and false-negative results may occur. Hemoculture can also be used as a diagnostic method but its sensitivity in chronic phase is limited due to the low/intermittent parasitemia. Molecular diagnosis methods have been studied and the main technique that has been extensively tested is the Polymerase Chain Reaction (PCR). This study aimed to evaluate the qualitative and quantitative PCR performance for diagnostic purposes in patients with megaesophagus. We studied DNA blood samples from 26 patients with negative or inconclusive conventional serology for Chagas disease and from 33 patients with positive serology. The most suitable target for qualitative PCR presenting high positivity was the Sat-DNA of *T. cruzi*. When compared to the quantitative results, the concordance between the two molecular methods in both groups was 72.72%. In addition, we observed that all patients with positive results of hemoculture had positive qualitative PCR. The qPCR methodology although highly sensitive could not detect minimal amounts of *T. cruzi* DNA in one patient with positive hemoculture. Our results indicate a possible misdiagnosis of patients with megaesophagus given by the negative or inconclusive serology for Chagas disease. Due to its good performance, the qualitative PCR is a useful tool to determine the megaesophagus etiology.

Keywords: Chagas disease, esophageal achalasia, molecular diagnostic techniques, real time polymerase chain reaction

LISTA DE ABREVIATURAS

LMCo	lise mediada por complemento
Ct	cycle threshold
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
DTU	discrete typing unit
E	eficiência
EDTA	ácido etileno diamino-tetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático
GEDoCh	Grupo de Estudos em Doença de Chagas
HAI	hemaglutinação indireta
Hc	hemocultura
IFI	imunofluorescência indireta
LIT	liver infusion tryptose
MLLE	multilocus enzyme electrophoresis
ND	não detectado
NR	não realizado
NTC	non template control
PCR	reação em cadeia da polimerase
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
rpm	rotações por minuto
Sat-DNA	DNA satélite
SMF	sistema mononuclear fagocitário
TCLE	Termo de Compromisso Livre e Esclarecido
UNG	uracil N-glycosylase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene da β -globina	49
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de Sat-DNA de <i>T. cruzi</i>	50
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de kDNA de <i>T. cruzi</i>	52
Tabela 4. Oligonucleotídeos e sondas utilizados na reação de qPCR	53
Tabela 5. Resultados de hemoculturas positivas do grupo II	55
Tabela 6. Resultados de testes moleculares, hemocultura e sorologia do grupo I	56
Tabela 7. Resultados de testes moleculares e hemocultura do grupo II.....	57
Tabela 8. Quantificação absoluta por qPCR de amostras do grupo I.	62
Tabela 9. Quantificação absoluta por qPCR de amostras do grupo II	63
Tabela 10. Resultados de PCR qualitativa e qPCR para os grupos I e II	64
Tabela 11. Positividade da PCR qualitativa e qPCR nos grupos I e II	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	19
Figura 2. Formas tripomastigotas sanguíneas de <i>T. cruzi</i>	19
Figura 3. Esquema representativo do ciclo da doença de Chagas	22
Figura 4. Classificação radiológica do megaesôfago	30
Figura 5. Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas na fase crônica.....	35
Figura 6. Esquema representativo da molécula de minicírculo do kDNA de <i>T. cruzi</i>	38
Figura 7. Resultados de PCR qualitativa para Sat-DNA e kDNA.....	58
Figura 8. Curva padrão de qPCR representada pelos pontos da diluição seriada de 10^6 a 10^0	60
Figura 9. Representação gráfica dos pontos da curva padrão de qPCR	61
Figura 10. Representação dos dados de quantificação absoluta de amostras	61

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.1.A doença de Chagas.....	16
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> como agente etiológico.....	17
1.3.Transmissão da doença de Chagas.....	20
1.3.1. Transmissão vetorial.....	20
1.3.2. Transmissão transfusional.....	23
1.3.3. Mecanismos de transmissão secundários.....	24
1.4.Aspectos clínicos	26
1.4.1. Fase aguda.....	26
1.4.2. Fase crônica.....	27
1.4.2.1.Forma crônica cardíaca	29
1.4.2.2.Forma crônica digestiva	29
1.5.Diagnóstico laboratorial	31
1.5.1. Diagnóstico parasitológico.....	32
1.5.2. Xenodiagnóstico.....	32
1.5.3. Hemocultura.....	33
1.5.4. Diagnóstico sorológico	33
1.5.4.1.Sorologia convencional e megaloesôfago chagásico.....	36
1.5.5. Diagnóstico molecular	36
1.5.6. Alvos diagnósticos.....	37
1.5.6.1.O DNA satélite de <i>T. cruzi</i>	38
1.5.7. Discordância entre sorologia convencional e PCR	40
1.5.8. PCR em tempo real.....	41
2. OBJETIVOS.....	43
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	44
3.1.Casuística.....	44
3.2.Métodos.....	45
3.2.1. Coleta e processamento de amostras	45
3.2.2. Hemocultura	46
3.2.3. Isolamento de DNA genômico	47
3.2.4. Testes moleculares	47

3.2.4.1.	Amplificação do gene da β -globina	48
3.2.4.2.	Amplificação do Sat-DNA de <i>T. cruzi</i>	49
3.2.4.3.	Amplificação do kDNA de <i>T. cruzi</i>	51
3.2.5.	Ensaio de qPCR	52
3.2.5.1.	Otimização da concentração de reagentes	52
3.2.5.2.	Obtenção dos pontos da curva padrão	53
3.2.5.3.	Quantificação absoluta das amostras	53
4.	RESULTADOS	55
4.1.	Hemocultura	55
4.2.	Testes moleculares qualitativos	55
4.3.	Testes moleculares quantitativos	59
4.3.1.	Confecção da curva padrão	59
4.3.2.	Quantificação absoluta das amostras por qPCR	61
4.3.3.	Correlação dos testes moleculares para detecção de Sat-DNA	64
5.	DISCUSSÃO	68
6.	CONCLUSÃO	74
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A doença de Chagas

A história natural da doença de Chagas (Chagas, 1909) iniciou-se há milhares de anos como enzootia de animais selvagens. Com a inserção do homem nos ecótopos naturais, a doença começou a ser transmitida acidentalmente como uma antropozoonose. A devastação florestal observada na América Latina nos últimos séculos propiciou a aproximação entre os vetores da doença e o homem, levando a uma adaptação desses vetores ao ambiente doméstico e peridoméstico (Coura, 2007).

O ciclo silvestre da doença de Chagas é ancestral e os principais reservatórios na natureza são os marsupiais (especialmente os gambás), roedores, tatus, tamanduás, pequenos carnívoros (gatos e cachorros-do-mato), coelhos, macacos e morcegos. O ciclo doméstico, mais recente, está relacionado à inserção humana no ambiente silvestre bem como às condições sócio-econômicas das populações atingidas (Cimerman & Cimerman, 2005).

A doença de Chagas humana é considerada uma endemia negligenciada de alto impacto de morbi-mortalidade na América Latina. Estima-se que haja de 7 a 8 milhões de indivíduos infectados em todo o mundo e a doença, antes confinada, sobretudo, à América Latina, vem atingindo países desenvolvidos devido à dinâmica populacional e mobilidade humana nas últimas décadas. No Brasil, estima-se de 3 a 4 milhões de infectados, sendo que um terço deles apresenta manifestações clínicas (Moncayo, 1999).

Embora o número de casos permaneça elevado e as estimativas de incidência

mundial sejam de aproximadamente 50.000 novos casos por ano, os financiamentos para pesquisa, prevenção e controle da doença de Chagas são limitados, além das opções terapêuticas permanecerem insatisfatórias (Tarleton et al, 2007).

Apesar de ter sido descrita há mais de um século pelo clínico Carlos Chagas, alguns aspectos ligados à patogênese da doença e a mecanismos intrínsecos da relação parasito-hospedeiro ainda permanecem pouco esclarecidos (Lages-Silva et al, 2001). A busca de novos testes diagnósticos eficientes configura uma etapa importante para o tratamento adequado dos pacientes, mobilizando profissionais da saúde, pesquisadores especializados e instituições internacionais (MSF, 2008).

1.2. *Trypanosoma cruzi* como agente etiológico

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, um eucarioto pertencente à ordem Kinetoplastida, que compreende organismos que apresentam uma região rica em DNA mitocondrial (kDNA). Esta região, denominada cinetoplasto, é única destes organismos (Moreira, Lopez-Garcia & Vickerman, 2004). O material genético do kDNA pode representar até 30% do DNA celular total (De Souza, 1999) e tem sido utilizado na investigação de características moleculares do parasito (Souto et al, 1996; Vago et al, 2000; Manoel-Caetano et al, 2008).

A morfologia de *T. cruzi* baseia-se na observação do parasito fixado em metanol e corado com Giemsa. Pode-se observar a presença do núcleo, do cinetoplasto e do flagelo. Com base na forma geral da célula, na posição relativa entre o núcleo e o cinetoplasto e na

saída do flagelo da bolsa flagelar, são definidas as formas evolutivas do tripanosomatídeo: amastigota, epimastigota e tripomastigota.

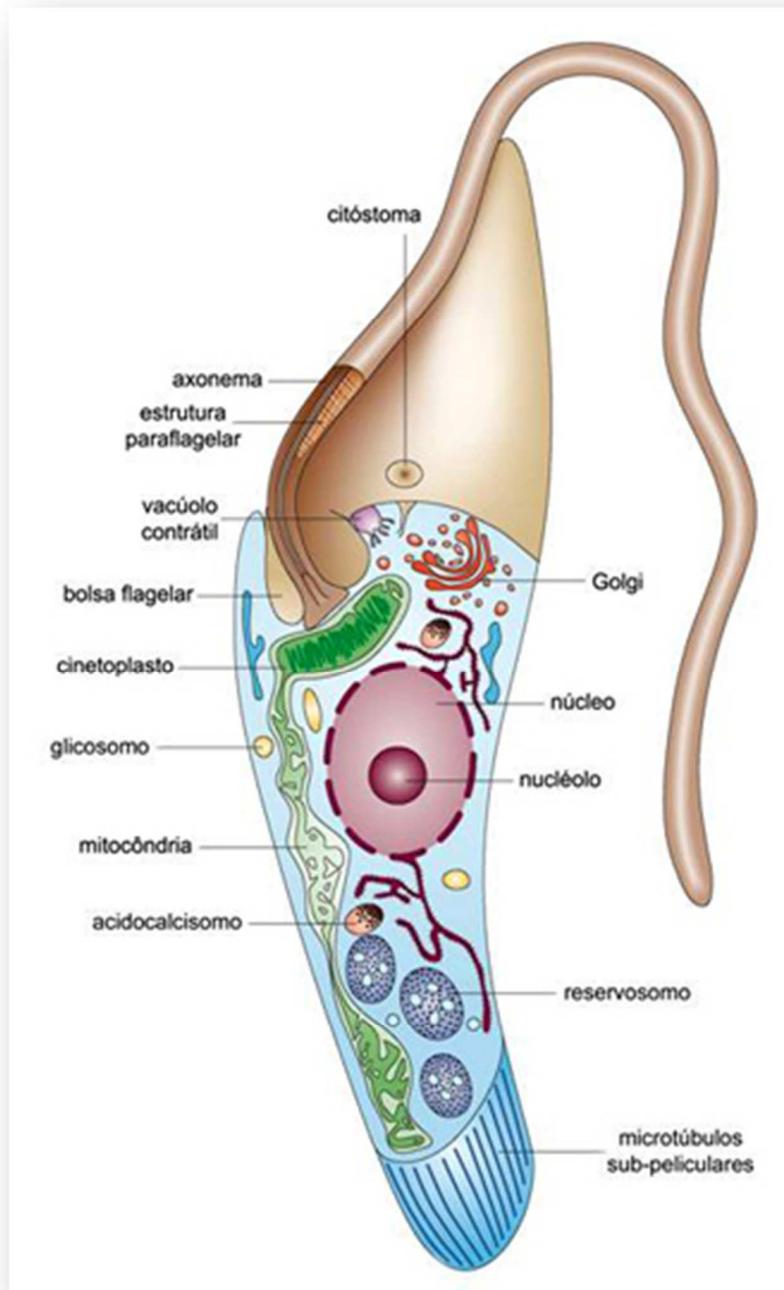


Figura 1. Esquema geral da forma epimastigota de *T. cruzi*. As principais estruturas celulares estão destacadas. Fonte: FIOCRUZ, 2008.

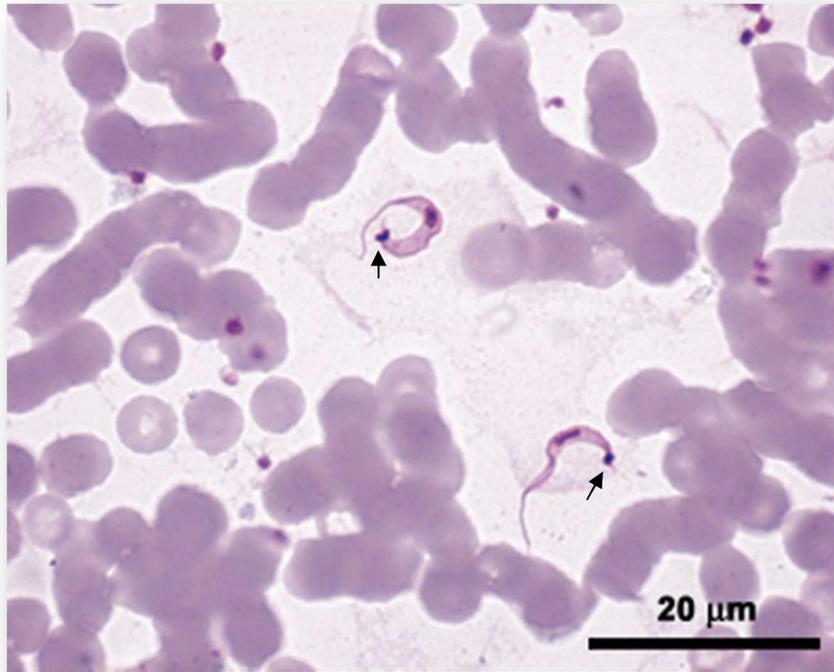


Figura 2. Formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*. As setas indicam o cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo. Fonte: FIOCRUZ, 2008.

A diversidade genética de *T. cruzi* vem sendo estudada já há algum tempo por diferentes abordagens buscando marcadores enzimáticos, polimorfismos, cariótipos moleculares, fingerprints de DNA, entre outros (Morel et al, 1980; Miles et al, 1980; Macedo et al, 1992). Tais pesquisas têm sido realizadas na tentativa de correlacionar as diferentes cepas a suas propriedades biológicas distintas, bem como às características clínicas e epidemiológicas da infecção (Moncayo & Yanine, 2006; Del Puerto, 2010).

Estudos iniciados por Miles et al (1977), com parasitos isolados de diferentes hospedeiros em várias regiões do Brasil, estabeleceram três grupos distintos com base no perfil eletroforético de isoenzimas ou MLEE (multilocus enzyme electrophoresis). Estes grupos foram designados zimodemas (Z1, Z2 e Z3). Estudos epidemiológicos demonstraram associação de Z1 e Z3 com o ciclo silvestre e Z2 com o ciclo doméstico (Miles et al 1980).

Estudos posteriores sugeriram a existência de duas linhagens filogenéticas principais de *T. cruzi* (grupos I e II). No Brasil, o grupo I está relacionado, geralmente, ao ciclo silvestre de *T. cruzi* e à infecção de marsupiais, enquanto o grupo II está associado ao ciclo peridoméstico (Fernandes et al, 1998).

Em 2009, Zingales et al propuseram uma nova classificação para as cepas do parasito, que recomenda o uso da nomenclatura baseada em seis tipos de DTUs (discrete typing units), denominados *T. cruzi* I, II, III, IV, V e VI. Segundo Tibayrenc (1998), os DTUs são sequências geneticamente mais relacionadas entre si do que com qualquer outra e podem ser identificadas pela genética, através de marcadores moleculares ou imunológicos. Elas representam unidades relevantes de pesquisa epidemiológica e, também, de estudos clínicos, de patogenicidade, de produção de vacinas e medicamentos, entre outros (Del Puerto et al, 2010; Sales-Campos et al, 2013)

1.3. Transmissão da doença de Chagas

1.3.1. Transmissão vetorial

A transmissão natural da doença de Chagas ocorre por meio vetorial. Os vetores são insetos triatomíneos hematófagos da família Reduviidae, popularmente conhecidos como “barbeiros” ou “chupanças”. O ciclo biológico de *T. cruzi* no homem inicia-se após o repasto sanguíneo do inseto como ilustrado na Figura 3. Após a picada, o triatomíneo infectado defeca próximo ao local e, ao coçar a região irritada, o indivíduo leva formas tripomastigotas metacíclicas, contidas nas fezes do vetor, para o interior da pele. A partir daí, ocorre invasão de células adjacentes ao local da picada e, após o parasito escapar para o citosol da célula hospedeira, as formas tripomastigotas metacíclicas diferenciam-se em formas amastigotas. A partir deste momento, ocorrem sucessivas divisões, tornando a célula repleta de parasitos. Após nova diferenciação de amastigotas em tripomastigotas, as formas flageladas são liberadas na corrente sanguínea, podendo a partir daí, serem seguidos dois caminhos: (1) formas tripomastigotas invadem novas células (SMF, células musculares: lisa, esqueléticas, cardíacas, nervosas, etc.), reiniciando o ciclo no hospedeiro ou (2) formas tripomastigotas podem ser ingeridas novamente por um triatomíneo, onde se diferenciarão em epimastigotas, e, posteriormente, em tripomastigotas metacíclicas com capacidade infectiva (De Souza, 1984).

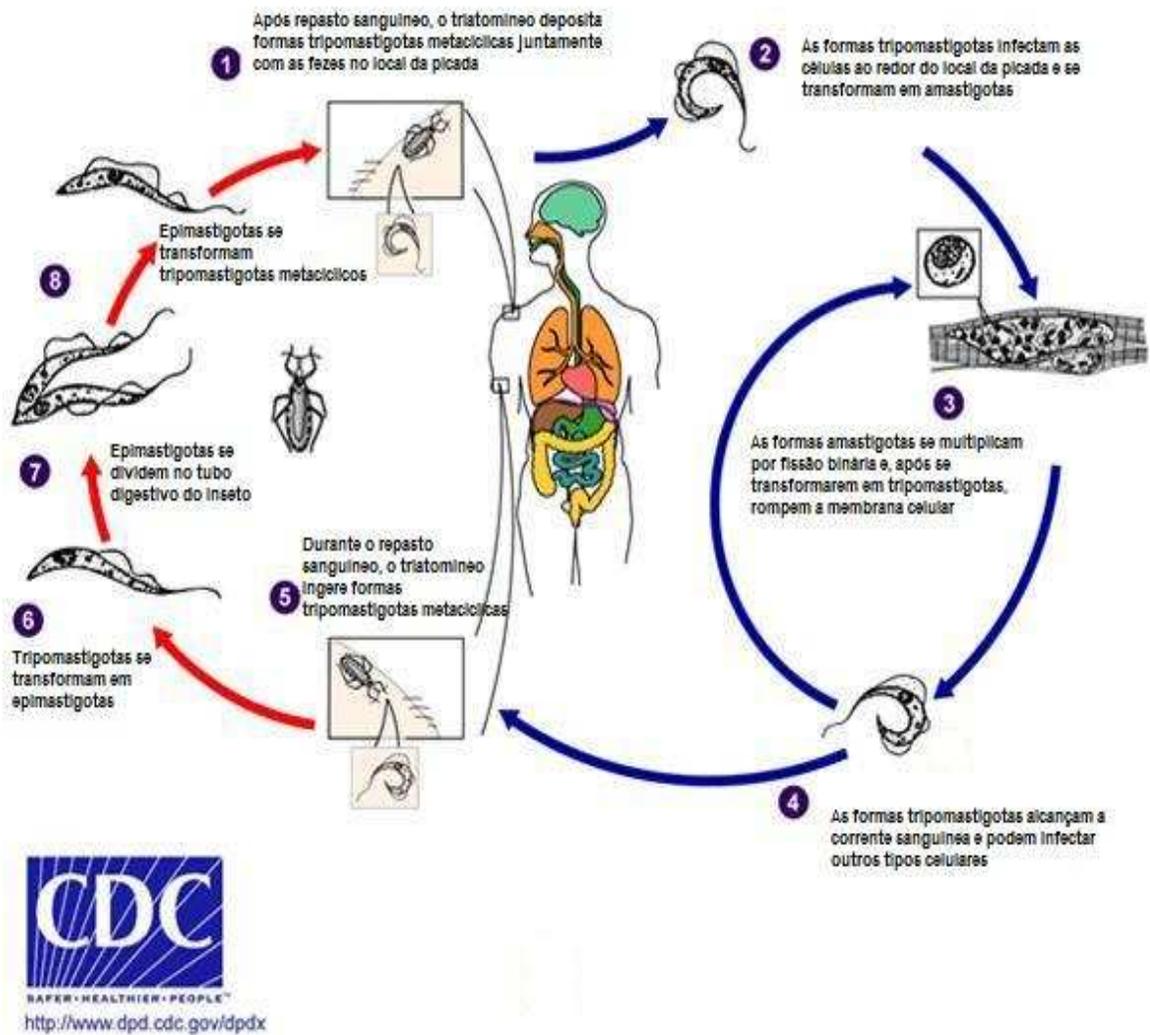


Figura 3. Esquema representativo do ciclo da doença de Chagas. Fonte: adaptado de CDC, 2007.

As diferentes espécies de triatomíneos conhecidas apresentam capacidades de transmissão distintas. Além disso, existem variações relacionadas à virulência da cepa de *T. cruzi*. Tais fatores associados à própria diversidade genética do hospedeiro resultam em uma alta complexidade da patogênese da doença de Chagas.

No ano de 2006, o Brasil recebeu o certificado de interrupção de transmissão vetorial por *Triatoma infestans*; até então, o principal vetor da doença em nosso país. A erradicação dos principais vetores é um dos objetivos principais da Iniciativa do Cone Sul, programa intergovernamental iniciado em 1991 reunindo seis países da América Latina. Pelo menos três desses países (Uruguai, Chile e Brasil) podem ser considerados livres de transmissão vetorial por *T. infestans* (WHO, 2008).

Apesar do controle da transmissão por *T. infestans* em nosso país, a doença de Chagas pode ser considerada emergente em algumas regiões consideradas livres da doença como a região da Bacia Amazônica, onde vetores silvestres são os principais agentes transmissores e microepidemias locais são observadas (WHO, 2008).

1.3.2. Transmissão transfusional

O segundo mecanismo mais frequente de transmissão da doença de Chagas é a via transfusional (Schmunis, 2000). Os mecanismos e estratégias de controle para evitar a transmissão transfusional foram desenvolvidos na década de 1950 e implementados na década de 1960. Mas, somente nos anos 80, os programas de controle em bancos de sangue foram totalmente instituídos nos países endêmicos (Wendel, 1997; Dias & Schofield, 1998). O controle da transmissão transfusional envolve, essencialmente, a triagem sorológica dos doadores de sangue (WHO, 1991; Wendel, 1997) e a melhoria da qualidade dos testes empregados quanto à sensibilidade e especificidade (Wanderley et al, 1993; Sáez-Alquézar et al, 1998; Umezawa et al, 2004). O risco de ocorrer infecção em um indivíduo, por uma única transfusão de um doador com sangue infectado é variável,

podendo chegar a 25% (Moncayo & Yanine, 2006). Entretanto, indivíduos que recebem múltiplas transfusões, como hemofílicos, pacientes com outras doenças hematológicas ou aqueles que realizam diálise, possuem uma chance 8,7 vezes maior de contaminação por *T. cruzi* (Schmunis, 1999).

Inicialmente, a transmissão transfusional assumiu uma grande importância epidemiológica devido ao movimento migratório de pessoas infectadas das zonas rurais endêmicas para as zonas urbanas, o que ocasionou aumento de indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* entre doadores de sangue no Brasil. Entretanto, o controle da transmissão vetorial levou a uma progressiva diminuição de doadores de sangue e de gestantes infectados, reduzindo os riscos de transmissão transfusional e congênita (Dias & Coura, 1997; Schofield & Dias, 1999).

1.3.3. Mecanismos de transmissão secundários

O terceiro mecanismo mais frequente da doença de Chagas é a transmissão vertical (via congênita ou transplacentária) com prevalência estimada em 0,5 a 8% (Schmunis, 2000), sendo que a probabilidade de ocorrência de doença em crianças de mães chagásicas varia de menos de 1 até 10% (Prata, 2001).

As formas de transmissão transfusional e congênita não se limitam às regiões endêmicas da doença de Chagas. Ultimamente, com a facilidade de migração de pessoas, muitos casos vêm sendo relatados em países considerados não endêmicos e que recebem grande contingente de imigrantes latinos. Em 2009, um estudo realizado em Barcelona

revelou prevalência de 41% entre 489 pacientes latino-americanos, a maioria originária da Bolívia (Muñoz et al, 2009). Na França, Lescure et al (2008) relataram o diagnóstico de nove casos da doença entre 2004 e 2006. Na Suíça foram relatados dois casos de transmissão congênita e um estudo retrospectivo detectou prevalência de 9,7% entre 72 gestantes latino-americanas (Jackson et al, 2009). Nos Estados Unidos, os casos importados de doença de Chagas não são mais excepcionais: estima-se que mais de 300.000 pessoas infectadas por *T. cruzi* residam atualmente nos Estados Unidos, sendo que a maioria delas adquiriu a doença em países endêmicos (CDC, 2013).

De fato, a migração internacional mudou o padrão epidemiológico da doença de Chagas, tornando-a um problema de saúde pública emergente em países da América do Norte e da Europa. A globalização da doença obriga estes países a estabelecerem medidas de prevenção e controle, principalmente na triagem de doadores em bancos de sangue, assim como o eventual seguimento e tratamento dos pacientes infectados (PAHO, 2005).

Outros mecanismos secundários de transmissão da doença de Chagas são os transplantes de órgãos e acidentes de laboratório. Um mecanismo de pequena importância epidemiológica, mas que pode se transformar em problema de saúde pública se não detectado ou se não tomadas precauções necessárias, é a transmissão da doença por via oral, com ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi* (Coura & Dias, 2009).

Esta forma de transmissão ganhou destaque em 2005, devido ao surto em Santa Catarina quando foram identificados 45 casos suspeitos de doença de Chagas aguda relacionados à ingestão de caldo de cana, sendo que cinco pacientes foram a óbito. Entre 2005 e 2007 o Ministério da Saúde/SVS recebeu a notificação de 22 surtos de doença

aguda em vários estados. Na maioria dos eventos, foi possível comprovar a associação da ocorrência de casos com o consumo de alimentos in natura, como caldo o de cana (Santa Catarina - 2005 e Bahia - 2006), bacaba (Maranhão, Pará - 2006) e açaí (Pará – 2006 e 2007, Amazonas – 2007 e 2008) (Souza-Lima, 2013).

1.4. Aspectos clínicos

Os determinantes da doença de Chagas resultam basicamente da quantidade de formas infectivas no inóculo inicial, da diversidade genética da cepa de *T. cruzi* e da resposta imune do hospedeiro (Coura, 2007). A interação desses fatores justifica o pleomorfismo da infecção.

Classicamente, a doença de Chagas é dividida em duas fases: a fase aguda, que tem início logo após a infecção por *T. cruzi* e a fase crônica, que pode permanecer assintomática por muitos anos (forma indeterminada) ou evoluir para as manifestações clínicas da doença (forma determinada) (Moncayo & Yanine, 2006).

1.4.1. Fase aguda

A fase aguda caracteriza-se por alta parasitemia e geralmente se apresenta assintomática ou oligossintomática, sendo reconhecida apenas em cerca de 1 a 2% dos casos com tendência a ser mais grave em crianças (Ribeiro & Rocha, 1998). Alguns indivíduos podem apresentar febre e mialgia durante algumas semanas. Na ausência de

tratamento adequado, cerca de 5 a 10% dos pacientes agudos sintomáticos vão a óbito devido ao desenvolvimento de encefalomielite ou insuficiência cardíaca grave e, em casos raros, morte súbita (Prata, 2001).

Uma reação inflamatória local, conhecida como chagoma, pode se desenvolver na porta de entrada do parasito. Quando a porta de entrada é a conjuntiva ocular, pode ser observado um edema periorbital conhecido como sinal de Romaña. Transmissão por via congênita ou oral, bem como através de transplante de órgãos e acidentes de laboratório também podem levar a casos agudos da doença (Moser et al, 1989).

O tratamento na fase aguda é particularmente eficaz com taxas de cura de 60 a 90% baseadas na negatização de provas sorológicas e parasitológicas. A terapêutica específica é recomendada em todos os casos de fase aguda, independente do mecanismo de transmissão (FUNASA, 1997), o que inclui a via congênita, transfusional e acidental.

No Brasil, o único composto disponível para tratamento etiológico da doença de Chagas é o benzonidazol (Rochagan®). Como o fármaco atua contra formas tripomastigotas sanguíneas, seu efeito é satisfatório na fase aguda uma vez que há muitos parasitos circulantes. Os efeitos de toxicidade relacionados ao medicamento são menos frequentes na fase aguda tanto em crianças quanto em adultos (Rassi, Rassi Jr & Gabriel Rassi, 2000).

1.4.2. Fase crônica

De dois a quatro meses após a infecção inicial, a doença entra em período de latência clínica, tornando-se crônica (Prata, 1984). A evolução da fase aguda para a fase crônica é acompanhada pela diminuição da parasitemia e elevação de anticorpos específicos da classe IgG. Grande parte dos infectados evolui para uma fase crônica assintomática, caracterizada pela presença da infecção, comprovada através de reações sorológicas específicas, mas livre de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas (Moncayo & Yanine, 2006). Estima-se que pelo menos 50% da população infectada apresentem a forma indeterminada da doença de Chagas (Ribeiro & Rocha, 1998). Apesar de assintomáticos, têm sido registrados casos de morte súbita em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas (Neves, 2005).

A doença crônica pode tornar-se clinicamente evidente anos ou décadas após a infecção inicial. Apenas 10 a 30% desses pacientes crônicos apresentam sintomas, sobretudo manifestações cardíacas e digestivas (Vaidian et al, 2004).

De acordo com o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (2005) o tratamento específico na fase crônica é recomendado principalmente em crianças. Embora faltem evidências de sucesso terapêutico, ele pode ser instituído na fase crônica recente em adultos (10 a 12 anos após a infecção inicial). Na fase crônica de maior duração, a presença das formas indeterminada, cardíaca leve e digestiva é indicação para tratamento etiológico. O objetivo, nestes casos, é diminuir a parasitemia e prevenir ou reduzir os sintomas da doença (WHO, 2002). Em estudo realizado recentemente, Machado-de-Assis et al (2013), mostraram que o tratamento etiológico com benzonidazol beneficiou os pacientes na forma indeterminada quanto à progressão da doença de Chagas e ao seu prognóstico.

1.4.2.1. Forma crônica cardíaca

A forma cardíaca da doença de Chagas é a mais prevalente no Brasil. Em indivíduos com comprometimento cardíaco, podem ser observadas alterações do ritmo cardíaco, fenômenos tromboembólicos e insuficiência cardíaca congestiva. Histologicamente, a forma cardíaca caracteriza-se por miocardite crônica intensa, fibrosante, com grande hipertrofia de cardiomiócitos. Cerca de 20 a 40% dos pacientes no Centro-Oeste e Sudeste do Brasil apresentam a forma cardíaca da doença de Chagas (Neves, 2005).

1.4.2.2. Forma crônica digestiva

Embora as manifestações cardíacas sejam comuns a todas as áreas geográficas onde a doença existe, a forma digestiva praticamente não ocorre em chagásicos que vivem nos países americanos situados acima da linha do Equador. Entretanto, ela é endêmica no Brasil Central, em áreas dos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Bahia, além de presente no Chile, Argentina e Uruguai. Estudos iniciados na década de 1950 levaram a uma melhor compreensão da relação entre doença de Chagas e megas digestivos observados em áreas endêmicas (Köberle & Nador, 1955). A manifestação mais frequente é o megaesôfago, seguido por megacólon (Malta, 1996).

A forma digestiva da doença de Chagas caracteriza-se por lesão dos plexos nervosos intramurais em decorrência do parasitismo das camadas musculares dos órgãos afetados, o que interfere na função motora principalmente do esôfago e do cólon, fazendo com que a

musculatura desses órgãos responda com contrações desordenadas (Sanchez-Lermen et al, 2007).

No Brasil, a doença de Chagas é a causa mais importante de megaesôfago. Diversos estudos sugerem a esofagopatia como um bom marcador da infecção chagásica no Brasil (Kamiji & de Oliveira, 2005; Peñaranda-Carrillo et al, 2006; Sanchez-Lermen et al, 2007). O comprometimento do esôfago é avaliado no estudo radiológico, através do qual é possível distinguir os estágios da doença (Crema et al, 2003). Seguindo o padrão de alterações morfológicas e motoras, o megaesôfago chagásico pode ser classificado em graus de I a IV (Rezende et al, 1960) conforme ilustrado na Figura 4. O estadiamento corresponde ao progressivo aumento de calibre do órgão.

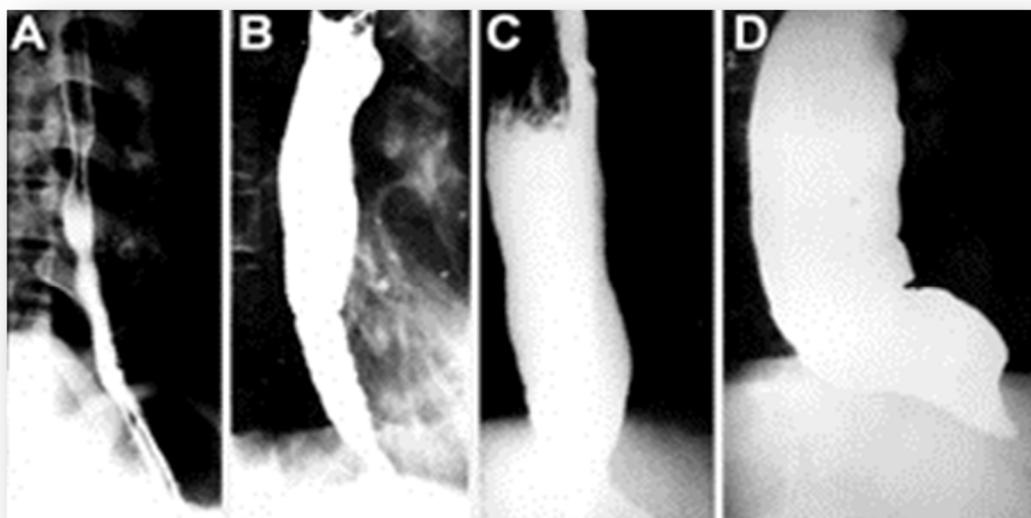


Figura 4. Classificação radiológica do megaesôfago. A: grau I (megaesôfago com calibre preservado); B: grau II; C: grau III; D: grau IV (megaesôfago avançado, com calibre bastante aumentado). Fonte: Rezende et al, 1960.

O megaesôfago, juntamente com o aparecimento de sintomas típicos como disfagia, regurgitação e emagrecimento, podem ocorrer após vários anos do diagnóstico sorológico e/ou do estabelecimento da lesão neuromotora. Entretanto, a presença de outros sintomas relacionados à lesão esofágica também comuns a outras doenças dificulta a interpretação etiológica como sendo decorrente da infecção por *T. cruzi* (Sanchez-Lermen et al, 2007).

O megacólon chagásico é relativamente frequente em nosso país. Dados divulgados em 2002 pela Organização Mundial da Saúde sugerem que cerca de 10 a 12% dos pacientes chagásicos crônicos desenvolvem megacólon. O quadro clínico da doença de Chagas afetando o intestino grosso caracteriza-se pelo aparecimento de constipação intestinal, que, geralmente, tem evolução lenta e progressiva (Santos Júnior, 2002). Em alguns casos pode ocorrer associação de comprometimento esofágico e do cólon em um mesmo paciente, caracterizando a forma digestiva mista da doença de Chagas. A presença de cardiopatia chagásica crônica também deve ser pesquisada nestes pacientes. Na evolução da doença de Chagas, a esofagopatia geralmente precede a cardiopatia (Rezende, 1960).

A escolha do tipo de tratamento dos megas digestivos depende de uma série de fatores como o grau de comprometimento do órgão, a idade e a condição clínica do paciente, sendo essencial definir a etiologia do megaesôfago e/ou megacólon para avaliação prognóstica e terapêutica.

1.5. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção por *T. cruzi* baseia-se em métodos parasitológicos e sorológicos, sendo orientado em função da fase clínica da infecção (Ferreira et al, 1996). Os métodos parasitológicos (diretos ou indiretos) têm como objetivo a busca do parasito enquanto os sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro dos indivíduos infectados.

1.5.1. Diagnóstico parasitológico

Os métodos parasitológicos podem ser diretos ou indiretos e são mais empregados na fase aguda da doença, uma vez que esta se caracteriza por alta parasitemia. Os métodos diretos incluem a pesquisa de parasitos por exame de sangue a fresco, gota espessa e esfregaço sanguíneo. O teste direto a fresco é mais sensível que o esfregaço corado por Giemsa e deve ser o método de escolha para diagnóstico etiológico na fase aguda. Caso sejam obtidos resultados negativos, devem ser utilizados métodos de concentração. Os testes de concentração (microhematócrito ou Strout) apresentam de 80 a 90% de positividade e são recomendados em casos de forte suspeita de doença de Chagas aguda e negatividade do exame de sangue a fresco. Em casos sintomáticos recentes, devem ser os testes de escolha, uma vez que a parasitemia tende a declinar com o tempo (Consenso do Ministério da Saúde, 2005).

1.5.2. Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico é um método parasitológico indireto introduzido por Brumpt (1914), com sensibilidade de 85 a 100% em pacientes na fase aguda da doença de Chagas e menor que 50% na fase crônica. Sua grande desvantagem é o desconforto na realização do exame e a demora para a obtenção dos resultados, que pode chegar até 90 dias (Rey, 1991; Ferreira & Ávila, 1995). A associação da hemocultura ao xenodiagnóstico é procedimento padrão principalmente quando as provas sorológicas são inconclusivas, em pacientes imunossuprimidos e no controle pós-terapêutico. Se empregados repetidas vezes, a sensibilidade das técnicas aumenta. O emprego rotineiro do xenodiagnóstico na fase crônica fica restrito principalmente devido à sensibilidade baixa, apresentando frequentemente resultados falso-negativos (Andersson, 2004).

1.5.3. Hemocultura

O cultivo de sangue ou hemocultura baseia-se na capacidade de *T. cruzi* crescer e se multiplicar em diferentes meios acelulares que contenham hemina ou derivados da hemoglobina. A técnica requer condições assépticas para a coleta e para o manuseio da amostra de sangue, o que a torna pouco prática nos trabalhos de campo. O protocolo desenvolvido por Chiari et al (1989) vem sendo modificado a fim de aumentar a sensibilidade do método (Luz, 1999).

1.5.4. Diagnóstico sorológico

Na fase crônica da doença de Chagas, o diagnóstico parasitológico direto torna-se comprometido em virtude da parasitemia baixa e intermitente. Entretanto, apesar do reduzido número de parasitos circulantes, títulos elevados de anticorpos específicos contra antígenos de *T. cruzi* podem ser detectados. Portanto, na fase crônica, o diagnóstico é essencialmente sorológico, baseando-se na pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro. A detecção desses anticorpos anti-*T. cruzi* pode ser realizada por técnicas de sorologia convencional como hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Dentre os métodos não convencionais, estão a lise mediada por complemento (LMCo), reação de Western blot, ELISA com antígenos recombinantes e reação de imunofluorescência por citometria de fluxo.

De forma geral, os métodos convencionais são bastante sensíveis, de fácil execução, apresentam baixo custo e fornecem resultados mais rápidos do que os métodos sorológicos não convencionais e os exames parasitológicos. No entanto, seu desempenho pode variar em função dos reagentes utilizados, dos procedimentos técnicos e dos critérios de interpretação de resultados.

A utilização de apenas um teste apresenta sensibilidade e especificidade em torno de 98,91 e 98,52%, respectivamente. A associação de dois ou três métodos aumenta a sensibilidade para cerca de 100% (Ferreira et al, 2001). Resultados falso-positivos ocorrem geralmente devido a reações cruzadas com outros tripanosomatídeos como *Leishmania* sp (Araújo, 1986; Chiler, Samudio & Zouler, 1990; Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003).

Segundo o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (2005), o diagnóstico etiológico na fase crônica deve ser realizado utilizando-se dois testes de princípios metodológicos diferentes: um teste de elevada sensibilidade (ELISA com antígeno total ou frações semipurificadas do parasito ou IFI) e outro de alta especificidade (ELISA, utilizando antígenos recombinantes específicos de *T. cruzi*), conforme descrito no fluxograma apresentado na Figura 5.



Figura 5. Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas na fase crônica. WB, Western Blot. Fonte: Ministério da Saúde, 2005.

1.5.4.1. Sorologia convencional e megaesôfago chagásico

Quando se realiza exame sorológico para doença de Chagas em portadores de megaesôfago em zona endêmica, obtém-se um índice de positividade aproximado de 90% (Rezende & Moreira, 2000). Entretanto, há pacientes com antecedentes epidemiológicos e manifestações clínicas sugestivas de doença de Chagas (megaesôfago) que apresentam reações sorológicas repetidamente negativas, conforme relatado por Luquetti (1987). A análise de 240 soros de pacientes com megaesôfago por HAI e hemaglutinação direta revelou 89,2% de resultados positivos. Dos 26 resultados negativos, 24 tinham epidemiologia positiva para doença de Chagas e em dois deles houve confirmação parasitológica. A ocorrência de xenodiagnóstico positivo em casos com sorologia negativa sugere a possibilidade de inexistência de anticorpos específicos circulantes (Brénière et al, 1984; Brénière et al, 1989).

1.5.5. Diagnóstico molecular

As limitações inerentes aos testes laboratoriais de rotina, especialmente em se tratando do diagnóstico na fase crônica, explicam o interesse e a necessidade de implantação de um método direto e mais sensível que permita monitorar a presença do parasito e confirmar a etiologia da doença de Chagas. Com o avanço da biologia molecular, novas técnicas têm sido descritas para auxiliar no diagnóstico das doenças infecto-parasitárias. Dentre estas técnicas, destaca-se a PCR (reação em cadeia da polimerase) (Saiki et al, 1988), baseada no emprego de oligonucleotídeos sintéticos que amplificam sequências gênicas específicas do patógeno-alvo.

A PCR apresenta boa sensibilidade, o que permite a detecção de quantidades mínimas de DNA de *T. cruzi*, facilitando o diagnóstico de pacientes crônicos que apresentam baixo número de parasitos na corrente sanguínea (Añez et al, 1999). O método tem sido utilizada como alternativa no diagnóstico da doença de Chagas; em alguns casos, a sensibilidade chega a 100% quando comparada a métodos sorológicos (Ávila et al, 1993). Entretanto, existem fatores como diferenças regionais, gravidade das formas clínicas e diferença genética dos isolados que podem contribuir para a variabilidade de resultados. O procedimento emprega reagentes e aparelhagem dispendiosos e também exige treinamento especializado e cuidados para evitar contaminação da amostra biológica.

A PCR pode ser empregada em bancos de sangue quando a sorologia é inconclusiva. Além disso, é um método interessante para controle pós-terapêutico devido sua maior sensibilidade frente às provas parasitológicas indiretas (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003). A detecção de *T. cruzi* pela PCR em transplantados é um procedimento mais sensível e específico para diagnosticar precocemente a reativação da doença de Chagas (Maldonado et al, 2004).

1.5.6. Alvos diagnósticos

A PCR tem sido aplicada para amplificação do kDNA de *T. cruzi* fazendo uso de oligonucleotídeos cujas sequências estão localizadas em regiões conservadas dos minicírculos (Figura 6). A amplificação parece ser espécie-específica e independente da cepa do parasito (Sturm et al, 1989). Muitos estudos clínicos utilizando a PCR para essa região mostram elevada sensibilidade e especificidade (Ávila et al, 1993; Britto et al, 1993;

Wincker et al, 1994; Vago et al, 1996; Chiari, 1999; Gomes et al, 1999). Entretanto, outros trabalhos reportam baixa sensibilidade do método (Britto et al, 1995; Junqueira et al, 1996).

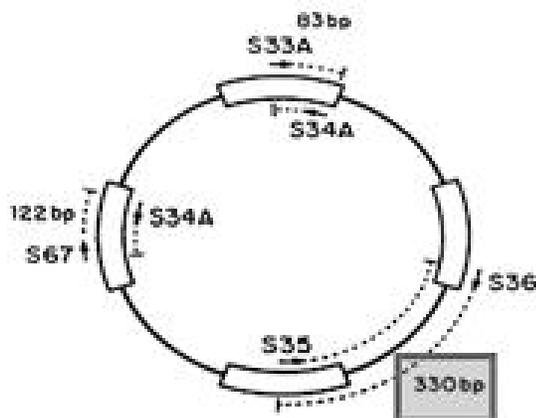


Figura 6. Esquema representativo da molécula de minicírculo do kDNA de *T. cruzi*. Assinaladas as regiões de seqüências conservadas (retângulos), as posições dos iniciadores da PCR (setas) e os respectivos produtos amplificados (pontilhado). Fonte: adaptado de Sturm et al, 1989.

Vera-Cruz et al (2003) utilizaram o método de PCR para amplificação da proteína flagelar Tc-24 específica de *T. cruzi*. A princípio, este método mostrou-se uma boa alternativa para acompanhamento da persistência do parasito (Andersson, 2004).

1.5.6.1. O DNA satélite de *T. cruzi*

A partir do sequenciamento gênico da cepa CL-Brener de *T. cruzi* realizado por El-Sayed et al (2005), estima-se que mais de 50% do genoma do parasito está associado com elementos repetitivos, tais como transposons e genes multi-cópias. Estas seqüências

repetitivas parecem ter papel importante na estrutura genômica e na expressão gênica de *T. cruzi*. Um elemento repetitivo do DNA satélite de 195 pb com 120.000 cópias por genoma foi a primeira sequência nuclear repetitiva descrita em *T. cruzi* (Gonzales et al, 1984).

Por constituir cerca de 9% do DNA nuclear total e não apresentar homologia com sequências de outros tripanosomatídeos que circulam na mesma área geográfica de *T. cruzi*, a família de sequências repetitivas de 195 pb (Sat-DNA) constitui um alvo adequado para o diagnóstico da doença de Chagas. Utilizando os oligonucleotídeos TCZ1 e TCZ2, Moser et al (1989), empregaram a PCR para detecção de DNA satélite de *T. cruzi* em amostras de sangue de pacientes chagásicos. Baseados neste estudo, outros grupos aprimoraram o mesmo protocolo para detecção de material genético do parasito em amostras de soro (Russomando et al, 1992), de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos (Virreira et al, 2003) e de tecido cardíaco (Olivares-Villagómez et al, 1998).

Estudos posteriores utilizaram a PCR para detecção do Sat-DNA de *T. cruzi* no monitoramento do tratamento etiológico para doença de Chagas em recém-nascidos. Os resultados obtidos confirmam a eficácia da técnica no controle de cura (Shikanai-Yasuda et al, 1996; Russomando et al, 1998).

A partir da padronização da técnica de PCR para amplificação de um fragmento de 149 pb, Marcon et al (2002) relataram uma boa especificidade na detecção de DNA satélite de *T. cruzi* em sangue de pacientes chagásicos crônicos. De 30 casos com sorologia inconclusiva para doença de Chagas, a PCR esclareceu 13. A sensibilidade da técnica foi de 82%. Utilizando o mesmo protocolo, Batista et al, 2010 obtiveram positividade acima de 90% para grupos de pacientes chagásicos com forma indeterminada e forma digestiva.

1.5.7. Discordância entre sorologia convencional e PCR

O diagnóstico etiológico da doença de Chagas ainda representa um desafio para clínicos e cientistas. Além dos resultados sorológicos falso-positivos, são encontrados relatos de resultados falso-negativos com PCR positiva. Estudando a população de uma área altamente endêmica em MG, Ávila et al (1993) encontraram resultados de PCR positiva em três pacientes soronegativos. Estudo realizado por Wincker et al (1994) mostrou dois resultados de PCR positiva em amostras de sangue de crianças soronegativas, sendo que em uma delas também houve observação direta do parasito no sangue.

Utilizando o kDNA como alvo diagnóstico, Gomes et al (1999) relataram PCR positiva em 10 de 21 pacientes soronegativos assintomáticos nascidos em área endêmica. Empregando um método sorológico não convencional baseado na detecção de anticorpos líticos, oito desses pacientes apresentaram resultados sorológicos negativos.

Ao pesquisar nove amostras de sangue de pacientes soronegativos também oriundos de área endêmica, Castro et al (2002) encontraram três casos de PCR positiva. A infecção chagásica foi também confirmada por hemocultura em um destes três casos. Por fim, utilizando como alvo uma sequência repetitiva de DNA satélite de *T. cruzi*, Salomone et al (2003) relataram 12 resultados de PCR positiva entre 80 pacientes argentinos soronegativos.

Na tentativa de elucidar a discordância entre resultados sorológicos e PCR, os pesquisadores tendem a descartar a hipótese de contaminação do DNA da amostra durante a reação de PCR uma vez que são utilizados controles negativos e os procedimentos são realizados cuidadosamente de forma a minimizar a possibilidade de contaminação. A

hipótese mais aceita para esta situação controversa baseia-se na variação de reações imunológicas do hospedeiro quando em contato com o parasito (Gomes et al, 1999; Castro et al, 2002; Salomone et al, 2003).

Pacientes infectados produzem anticorpos contra muitos antígenos de *T. cruzi* e esses exibem grandes diferenças qualitativas e quantitativas (Mendes et al, 1997). Segundo Brénière (1984), 2,6% dos pacientes chagásicos crônicos incluídos em seu estudo apresentaram importante imunossupressão de anticorpos específicos contra o parasito, resultando em imunodiagnóstico negativo para a doença, mesmo com a confirmação da infecção por *T. cruzi* através do xenodiagnóstico (Brénière et al, 1988).

Deste modo, supõe-se que algumas cepas do parasito não induzam a resposta humoral no homem. Em não havendo o reconhecimento de anticorpos anti-*T. cruzi*, têm-se resultados falso-negativos. Sendo assim, a etiologia chagásica não deve ser afastada, mesmo na ausência de confirmação por provas sorológicas, se existirem antecedentes epidemiológicos e indicadores clínicos da doença de Chagas (Luquetti, 1987).

1.5.8. PCR em tempo real

Atualmente, a PCR pode ser considerada como técnica padrão-ouro para a detecção de DNA de parasitos circulantes na doença de Chagas. Entretanto, existe a necessidade de se estabelecer um protocolo consenso. Essa preocupação decorre da alta variabilidade nos níveis de sensibilidade gerada pelos diferentes protocolos já descritos. Os resultados dependem das características epidemiológicas das populações estudadas, do volume de

sangue coletado, do método utilizado para extração de DNA, da sequência alvo e oligonucleotídeos, dos reagentes e das condições de PCR (Britto, 2009).

Os testes para detecção de material genético de *T. cruzi* vem sendo aperfeiçoados com o desenvolvimento de sistemas de qPCR (Piron et al, 2007; Duffy et al, 2009; Freitas, 2011; Schijman, 2011; Qvarnstrom, 2012). A implementação de um ensaio capaz de quantificar a carga parasitária de pacientes chagásicos e monitorar a parasitemia em resposta ao tratamento etiológico pode ser particularmente útil como um indicador da eficácia terapêutica (Britto, 2009). Além disso, é útil no esclarecimento de casos de pacientes que apresentam manifestações clínicas sugestivas de doença de Chagas, mas tem sorologia inconclusiva ou negativa.

Nos últimos anos, os esforços se concentram na padronização e validação de um método consenso para ser utilizado por laboratórios de pesquisa e centros de referência ao redor do mundo (Schijman et al, 2011; Moreira et al, 2013). Um projeto internacional envolvendo 26 laboratórios de 16 países buscou avaliar e definir o método mais adequado para diagnóstico molecular da doença de Chagas. Foi encontrada uma alta variabilidade de especificidades e sensibilidades entre os diferentes protocolos de PCR utilizados em cada laboratório. Foram selecionados quatro métodos com melhor desempenho para testes em um painel de amostras clínicas, sendo dois protocolos de PCR convencional e dois de qPCR (Schijman et al, 2011). A continuidade deste estudo deve trazer a validação de um procedimento operacional padrão para PCR de *T. cruzi* nos próximos anos.

2. OBJETIVOS

1. Detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras de sangue de pacientes portadores de megacôlon empregando técnicas moleculares qualitativas;

2. Otimização e aplicação do teste de qPCR para quantificação da carga parasitária;

3. Análise comparativa das técnicas utilizadas.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

A triagem de pacientes deu-se a partir do levantamento de prontuários eletrônicos no banco de dados do Hospital de Clínicas/UNICAMP com apoio do Núcleo de Informática. Os critérios de busca foram baseados nos códigos de CID-10 de pacientes atendidos em ambulatórios do Hospital de Clínicas no período de 1999 a 2009. Após a identificação destes pacientes, foram verificados no sistema eletrônico e nos prontuários, os resultados prévios de exames sorológicos convencionais para doença de Chagas (IFI e ELISA). Eventualmente, também foram incluídos pacientes que passaram por consulta médica no ambulatório do Grupo de Estudo em Doença de Chagas (GEDoCh) no período de desenvolvimento da pesquisa e que se adequavam aos critérios de inclusão.

Critérios de inclusão no estudo:

- CID B57.3: doença de Chagas crônica com comprometimento do aparelho digestivo e/ou CID K23.1: megaesôfago na doença de Chagas;
- Resultados de sorologia convencional disponível para doença de Chagas;
- Concordância com a participação no estudo pela assinatura do Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE).

Critérios de exclusão do estudo:

- Histórico de tratamento específico para doença de Chagas;
- Recusa de participação no estudo.

Sendo assim, a casuística do estudo foi composta da seguinte forma:

Grupo I (grupo experimental): 26 pacientes de ambos os sexos portadores de megaesôfago com sorologia não-reagente ou inconclusiva para doença de Chagas em seguimento no Hospital de Clínicas / UNICAMP.

Grupo II (grupo controle positivo): 33 pacientes de ambos os sexos portadores de megaesôfago com sorologia reagente para doença de Chagas em seguimento no Hospital de Clínicas / UNICAMP.

Grupo III (grupo controle negativo): 10 indivíduos de ambos os sexos procedentes de áreas não-endêmicas e com sorologia negativa para doença de Chagas.

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta e processamento de amostras

Após a assinatura do TCLE aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (parecer nº 779/2007) pelos pacientes, procedeu-se à coleta de sangue periférico por via intravenosa. Os procedimentos foram realizados pela equipe de enfermagem do Centro de Coleta do Hospital de Clínicas/UNICAMP, em dias e horários diferentes, de acordo com a disponibilidade dos pacientes convocados.

Todos os pacientes, no momento da coleta de sangue para a realização de testes moleculares, fizeram a sorologia convencional para doença de Chagas com o intuito de confirmar os resultados prévios de sorologia inconclusiva e/ou negativa emitidos pela divisão de Patologia Clínica/UNICAMP.

O material biológico coletado foi processado adequadamente para que o processo subsequente de isolamento de DNA genômico não fosse prejudicado. Este processamento constituiu-se na identificação correta das amostras, bem como no transporte e armazenamento em temperatura adequada (4°C) no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular.

Nos casos em que houve coleta de sangue para hemocultura, as amostras foram imediatamente submetidas ao procedimento descrito a seguir.

3.2.2. Hemocultura

A hemocultura foi realizada segundo Chiari et al (1989) e Luz et al (1999), com modificações. Dessa forma, foram utilizados 20 mL de sangue venoso coletados em tubos a vácuo contendo EDTA. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C, o plasma removido e as hemácias lavadas com meio LIT. A seguir, o sobrenadante foi removido e o sedimento de hemácias homogeneizado com 10 mL de LIT para distribuição em 5 tubos (2mL/tubo). As culturas foram mantidas em estufa a 28 °C e o exame microscópico foi realizado após 15 dias da coleta. As leituras subsequentes foram feitas quinzenalmente até a positivação do teste ou até que se completasse o período total

de 150 dias pós-coleta. A coleta de sangue para hemocultura foi feita no mesmo dia da coleta para realização da sorologia e dos testes moleculares.

3.2.3. Isolamento de DNA genômico

Com o objetivo de garantir a ótima qualidade do DNA para a realização da PCR quantitativa em tempo real (qPCR), foi utilizado o kit High Pure PCR Template Preparation (Roche) para isolamento de DNA de buffy coat proveniente da centrifugação das amostras de sangue total coletadas dos pacientes. O método seguiu as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Assim, foram adicionados a um tubo de microcentrífuga, 200 μ L de buffy coat, 200 μ L de tampão de ligação e 40 μ L de proteinase K reconstituída. A mistura foi imediatamente homogeneizada e incubada a 70 °C por, no mínimo, 15 minutos. A seguir, adicionou-se 100 μ L de isopropanol. O material homogeneizado foi adicionado à coluna e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, o material retido na coluna foi tratado com 500 μ L de tampão específico para remoção de inibidores. Foram realizadas duas lavagens subsequentes e, após a centrifugação final, conforme descrito na bula do kit, o DNA retido na coluna foi eluído em 100 μ L de tampão de eluição pré-aquecido a 70 °C. O material biológico obtido foi armazenado a -20 °C para ser utilizado posteriormente nas reações moleculares.

3.2.4. Testes moleculares

Neste estudo, foram realizados os seguintes testes moleculares: amplificação por PCR qualitativa do gene da β -globina humana, da região nuclear e do kDNA de *T. cruzi* e quantificação absoluta por qPCR utilizando a região nuclear de *T. cruzi* como alvo.

3.2.4.1. Amplificação do gene da β -globina humana

A integridade do material genético extraído foi verificada pelo uso da técnica de PCR para detecção de uma região do gene da β -globina humana. Foi utilizado o método descrito por Saiki et al (1985), com modificações. Assim, em um tubo de microcentrífuga foi adicionado cerca de 400 ng de DNA; KCl 50mM; Tris-HCl 10mM pH 8,4; MgCl₂ 2,5 mM; dNTPs 200mM; 0,1 mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 1 ciclo de 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação), 1 min a 55 °C (anelamento) e 1 min a 72 °C (extensão). A extensão final foi realizada a 72 °C durante 7 min.

O produto de aproximadamente 365 pb obtido a partir da PCR foi utilizado como controle interno da reação para todas as amostras, indicando boa qualidade do DNA extraído e ausência de inibidores na reação.

Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene da β -globina.

Oligonucleotídeo	Seqüência nucleotídica 5' → 3'
P3	AGACAGAGAAGACTCTTG
P5	TCATTCGTCTGTTTCCCATTC
109	CCCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT

3.2.4.2. Amplificação do Sat-DNA de *T. cruzi*

A reação de PCR seguiu, com algumas modificações, o método descrito anteriormente (Moser et al, 1989; Kirchhoff et al, 1996; Ochs et al, 1996; Russomando et al, 1998). Assim, em um tubo de microcentrífuga foi adicionado cerca de 1,0 μ L de DNA; KCl 50mM; Tris-HCl 10mM pH 8,4; MgCl₂ 2,5 mM; dNTPs 200mM; 0,1 mM de cada oligonucleotídeo iniciador (TCZ1 e TCZ2) e 2 U da enzima Taq DNA polimerase para um volume final de 20 μ l.

Para a segunda reação, cerca de 1,0 μ l do produto amplificado anteriormente foi utilizado como molde e os oligonucleotídeos substituídos por TCZ3 e TCZ4. O amplicon de aproximadamente 149 pb é interno ao fragmento de 188 pb amplificado na primeira reação. Além dos oligonucleotídeos, a concentração de MgCl₂ foi modificada na segunda reação para 2,8 mM.

Os ciclos de amplificação foram diferenciados para as duas reações. Ambas foram precedidas por uma desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min e a extensão final foi realizada a 72 °C por 7 min.

Na primeira reação, foram utilizados 30 ciclos:

Os primeiros 5 ciclos:

- Desnaturação: 94 °C por 1 min;
- Anelamento: 60 °C por 1 min;
- Extensão: 72 °C por 1 min e 30 s.

Os 25 ciclos seguintes:

- Desnaturação: 94 °C por 1 min;
- Anelamento: 65 °C por 1 min;
- Extensão: 72 °C por 1 min e 30 s.

Na segunda reação, foram realizados 25 ciclos nas seguintes condições:

- Desnaturação: 94 °C por 40 s;
- Anelamento: 55 °C por 40 s;
- Extensão: 72 °C por 1 min.

Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de Sat-DNA de *T. cruzi*.

Oligonucleotídeo	Sequência nucleotídica 5'→ 3'
TCZ1	CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT
TCZ2	CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG
TCZ3	TGCTGCA(G/C)TCGGCTGATCGTTTTCGA

3.2.4.3. Amplificação do kDNA de *T. cruzi*

Para a primeira reação de amplificação, em um tubo de microcentrífuga foi adicionado cerca de 1,0 µL de DNA; KCl 50mM; Tris-HCl 10mM pH 8,4; MgCl₂ 4 mM; dNTPs 200mM; 0,1 mM de cada oligonucleotídeo iniciador (S67 e S35) e 2 U da enzima Taq DNA polimerase para um volume final de 30 µl.

Para a segunda reação, cerca de 1,0 µl do produto amplificado anteriormente foi utilizado como molde e os oligonucleotídeos utilizados foram S35 e S36. O amplicon de aproximadamente 330 pb é interno ao fragmento de 1050 pb amplificado na primeira reação.

Os ciclos de amplificação foram diferenciados para as duas reações. Ambas foram precedidas por uma desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min e a extensão final foi realizada a 72 °C por 7 min.

Na primeira reação, foram utilizados 35 ciclos:

- Desnaturação: 94 °C por 1 min;
- Anelamento: 56 °C por 1 min;
- Extensão: 72 °C por 1 min.

Na segunda reação, foram realizados 35 ciclos nas seguintes condições:

- Desnaturação: 94 °C por 30 s;
- Anelamento: 63 °C por 45 s;
- Extensão: 72 °C por 1 min.

Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de kDNA de *T. cruzi*.

Oligonucleotídeo	Sequência nucleotídica 5'→3'
S67	TGGTTTTGGGAGGGG(C/G)(G/C)(T/G)TCAA(A/C)TTTT
S35	AGTACGTAGAG(T/G)GGGCATGTAATAAA
S36	GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT

3.2.5. Ensaios de qPCR

3.2.5.1. Otimização da concentração de reagentes

Para fins de otimização da reação de qPCR, foram realizados testes utilizando diferentes concentrações de oligonucleotídeos (cruzi 1 e cruzi 2) e sonda (cruzi 3) (Tabela 4), sendo 150 nM, 300 nM, 500 nM e 750 nM. A melhor concentração ajustada foi de 500 nM de cada oligonucleotídeo e de 200 nM da sonda. Comparativamente ao protocolo de referência (Piron et al, 2007), foi possível obter resultados satisfatórios com menor concentração dos reagentes, evitando gasto desnecessário dos mesmos.

Tabela 4. Oligonucleotídeos e sonda utilizados na reação de qPCR (modificado de Piron et al, 2007).

	Sequência (5'-3')	Posição nucleotídica*
Cruzi 1 (forward)	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA	27-46
Cruzi 2 (reverso)	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	172-192
Cruzi 3 (sonda)	CACACACTGGACACCAA	143-159

*posição nucleotídica na sequência de DNA satélite (GenBank nº AY520036)
R: A/G; S: C/G

3.2.5.2. Obtenção dos pontos da curva padrão

Culturas de formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em meio LIT a 28 °C com repiques quinzenais. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 10^7 parasitos/mL. Uma amostra de sangue de indivíduo saudável foi contaminada com concentração conhecida de parasitos e, a partir desta alíquota, foi realizado o isolamento de DNA genômico com o kit High Pure PCR Template Preparation (Roche). A seguir, foram feitas diluições seriadas (10X) do DNA extraído nas concentrações de 10^6 a 10^{-2} parasitos/mL. Estes pontos diluídos foram utilizados para a construção da curva padrão da reação de qPCR.

3.2.5.3. Quantificação absoluta das amostras

Para a reação de amplificação de DNA em tempo real, em um tubo de microcentrífuga foram adicionados TaqMan® Universal Master Mix com UNG (Applied

Biosystems) 1X, 500 nM de cada oligonucleotídeo (cruzi 1 e cruzi 2), 200 nM da sonda e RNase P (Applied Biosystems) 0,1X e 5 µL de DNA para um volume final de 50 µl.

Todos os pontos utilizados para a construção da curva padrão (10^6 a 10^{-2} parasitos/mL) foram amplificados em triplicata e o DNA das amostras clínicas foi amplificado em duplicata. A reação de qPCR foi realizada no equipamento Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) nas seguintes condições:

- Hold: 2 min a 50°
- Hold 2: 10 min a 95°
- Ciclagem (45 vezes): 15 s a 95° e 60 s a 58°

Para evitar contaminação do tipo carryover, foi utilizado o kit TaqMan® Universal Master Mix contendo AmpErase® UNG. A enzima recombinante UNG é capaz de degradar fragmentos de DNA pré-amplificados, impedindo sua reamplificação e consequentes resultados falso-positivos.

O gene humano da RNase P foi utilizado como controle interno da reação de amplificação. A ausência de contaminantes nos reagentes utilizados foi assegurada pela utilização de amostra NTC, a qual não continha a sequência alvo.

Os dados da quantificação absoluta em tempo real foram gerados pelo software Rotor-Gene 1.7.87.

4. RESULTADOS

4.1. Hemocultura

Foram realizados ensaios de hemoculturas de 34 pacientes dos grupos I e II. Não se observou positividade nas amostras do grupo I, enquanto no grupo II, a positividade foi de 22,72% (5/22). O tempo médio pós-coleta para positividade do teste foi de aproximadamente 58 dias. A quantidade de tubos positivos por paciente variou de um a quatro tubos (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados de hemoculturas positivas do grupo II.

Paciente	Positividade (dias pós-coleta)	Tubos positivos
ELR	85	2/3
HCS	61	1/5
IBR	35	2/5
LAM	37	4/5
LLB	71	2/5

4.2. Testes moleculares qualitativos

O DNA de amostras de sangue de 69 indivíduos foi isolado pelo kit High Pure PCR Template Preparation (Roche), sendo 26 pacientes do grupo I, 33 pacientes do grupo II e 10 indivíduos saudáveis (grupo III). Os resultados de PCR qualitativa para β -globina, Sat-DNA e kDNA, a leitura dos ensaios de hemocultura (Hc) e sorologia convencional para as amostras do grupo I constam na Tabela 6. As amostras de sangue para os testes sorológicos

foram coletadas no mesmo dia dos testes parasitológicos realizados em nosso laboratório. Os resultados de sorologia (ELISA e IFI) foram obtidos pelo sistema de prontuário eletrônico do Hospital de Clínicas. Considerou-se resultado inconclusivo quando houve discordância entre os dois testes sorológicos e não reagente quando ambos os testes apresentaram-se negativos.

Tabela 6. Resultados de testes moleculares, hemocultura e sorologia do grupo I.

	Paciente	β -globina	Sat-DNA	kDNA	Hc	Sorologia convencional
1	AFS	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa	Inconclusiva
2	AG	Positiva	Positiva	Negativa	NR	Inconclusiva
3	ANS	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	Inconclusiva
4	CLS	Positiva	Positiva	Positiva	NR	Não reagente
5	CPSS	Positiva	Negativa	Negativa	NR	Não reagente
6	CRS	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	Não reagente
7	GFS	Positiva	Positiva	Positiva	NR	Não reagente
8	GJC	Positiva	Positiva	Negativa	NR	Inconclusiva
9	GSA	Positiva	Positiva	Negativa	NR	Não reagente
10	IGF	Positiva	Positiva	NR*	NR	Inconclusiva
11	JAP	Positiva	Positiva	Positiva	NR	Não reagente
12	JLR	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	Inconclusiva
13	LBS	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	Inconclusiva
14	MDSO	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Não reagente
15	MEJ	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	Não reagente
16	NTS	Positiva	Negativa	Negativa	NR	Não reagente
17	NTE	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa	Inconclusiva
18	OEM	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Inconclusiva
19	OSS	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Inconclusiva
20	OVP	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	Não reagente
21	PCM	Positiva	Positiva	NR*	NR	Inconclusiva
22	RMNB	Positiva	Positiva	Negativa	NR	Não reagente
23	RO	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Inconclusiva
24	SSS	Positiva	Negativa	Negativa	NR	Não reagente
25	TFA	Positiva	Negativa	Negativa	NR	Não reagente
26	TMR	Positiva	Positiva	Negativa	NR	Inconclusiva

NR: não realizado; NR* : não realizado por amostra insuficiente

Neste grupo, a PCR para detecção de Sat-DNA apresentou positividade de 76,92% (20/26) enquanto a PCR para detecção de kDNA foi positiva em 37,5% (9/24) dos casos.

Dos 20 pacientes com PCR positiva para Sat-DNA, 18 deles tinham epidemiologia positiva para doença de Chagas.

Os resultados de PCR qualitativa para β -globina, Sat-DNA e kDNA e a leitura dos ensaios de hemocultura para as amostras do grupo II constam na Tabela 7. Em todos os casos, a sorologia foi positiva por ELISA e IFI.

Tabela 7. Resultados de testes moleculares e hemocultura do grupo II.

	Paciente	β -globina	Sat-DNA	kDNA	Hc
1	AADS	Positiva	Negativa	Negativa	NR
2	AGS	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa
3	AMCS	Positiva	Negativa	Negativa	NR
4	AOSP	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
5	APM	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
6	APS	Positiva	Positiva	NR*	NR
7	CCSL	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
8	CG	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa
9	ECP	Positiva	Negativa	NR*	NR
10	ELR	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
11	EPSS	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa
12	ESS	Positiva	Positiva	Negativa	NR
13	HCS	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva
14	IBR	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
15	JASP	Positiva	Negativa	NR*	NR
16	JBS	Positiva	Positiva	NR*	Negativa
17	JDO	Positiva	Positiva	NR*	NR
18	JNQ	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
19	JNS	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa
20	LAM	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
21	LLB	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva
22	MFFC	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
23	MFLA	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa
24	MVV	Positiva	Positiva	Positiva	NR
25	NCS	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa

26	NGS	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
27	NVS	Positiva	Negativa	Negativa	NR
28	OAP	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa
29	OGM	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa
30	OM	Positiva	Positiva	NR*	Negativa
31	TTS	Positiva	Negativa	Negativa	NR
32	VRV	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa
33	ZOV	Positiva	Positiva	NR*	NR

NR: não realizado; NR* : não realizado por amostra insuficiente

No grupo II, a positividade da PCR para Sat-DNA e kDNA foram, respectivamente, 63,63% (21/33) e 38,46% (10/26). O teste utilizando Sat-DNA apresentou maior positividade em ambos os grupos (Figura 7).

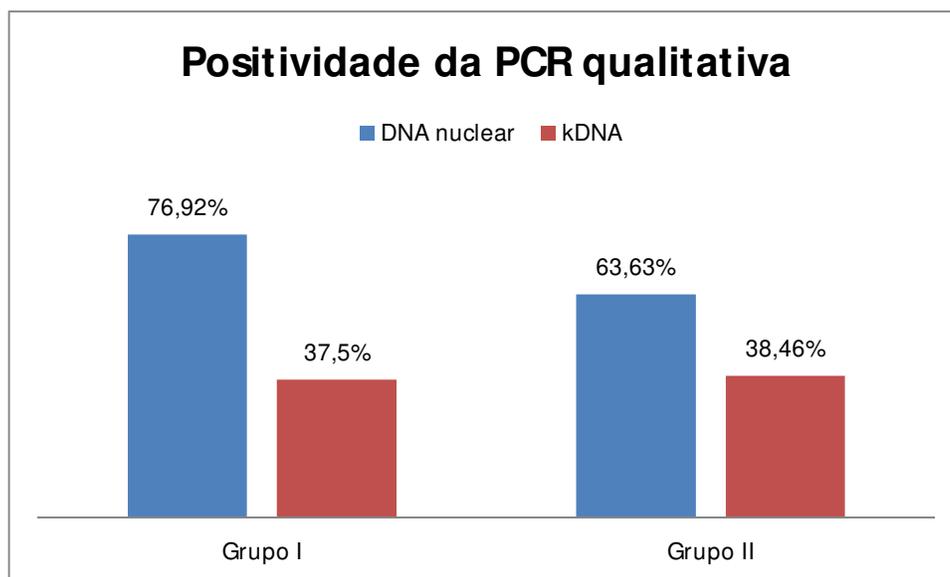


Figura 7. Resultados de PCR qualitativa para Sat-DNA e kDNA.

As amostras de 10 indivíduos saudáveis do grupo III foram testadas pelos mesmos métodos moleculares e nenhuma delas apresentou resultado positivo para a doença de Chagas, garantindo a confiabilidade dos métodos utilizados.

4.3. Testes moleculares quantitativos

Após a padronização da concentração dos reagentes para a reação de qPCR descrita no item 3.2.5.1. e a obtenção dos pontos para a curva padrão, procedeu-se à confecção da mesma.

4.3.1. Confecção da curva padrão

Foram realizados diversos testes utilizando pipetas manuais e automáticas e tubos comuns e de baixa retenção, não sendo observada diferença relevante entre os tipos de pipetas e os tipos de tubos testados.

A curva padrão mostrada na Figura 8 apresenta parâmetros considerados adequados para a confiabilidade dos resultados. A eficiência obtida foi de 100% (valor ideal entre 95-100%), slope de -3,32 (valor ideal= -3,32) e R^2 de 0,98 (valor ideal= 0,99). Foi obtida linearidade entre os pontos 10^6 e 10^0 , o que resulta em uma curva padrão com sete pontos. As análises foram geradas automaticamente pelo software Rotor-Gene 1.7.87.

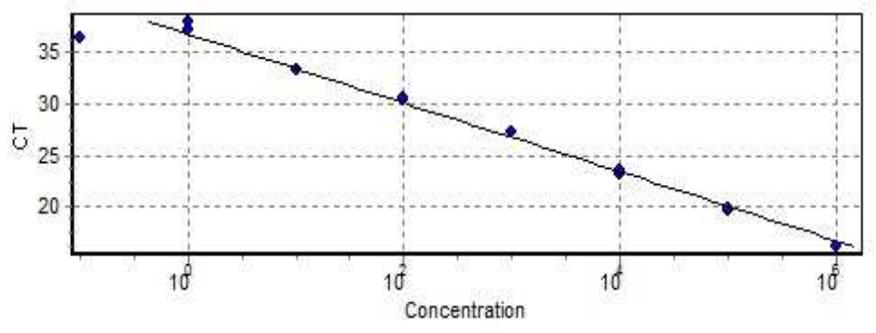


Figura 8. Curva padrão de qPCR representada pelos pontos da diluição seriada de 10^6 a 10^0 . A partir do ponto 10^{-1} não se observa linearidade. E=100%.

Na Figura 9, estão apresentados os perfis de amplificação dos pontos incluídos na construção da curva padrão. Cada ponto foi amplificado em triplicata e o threshold foi configurado manualmente na região exponencial da amplificação, conforme é recomendado.

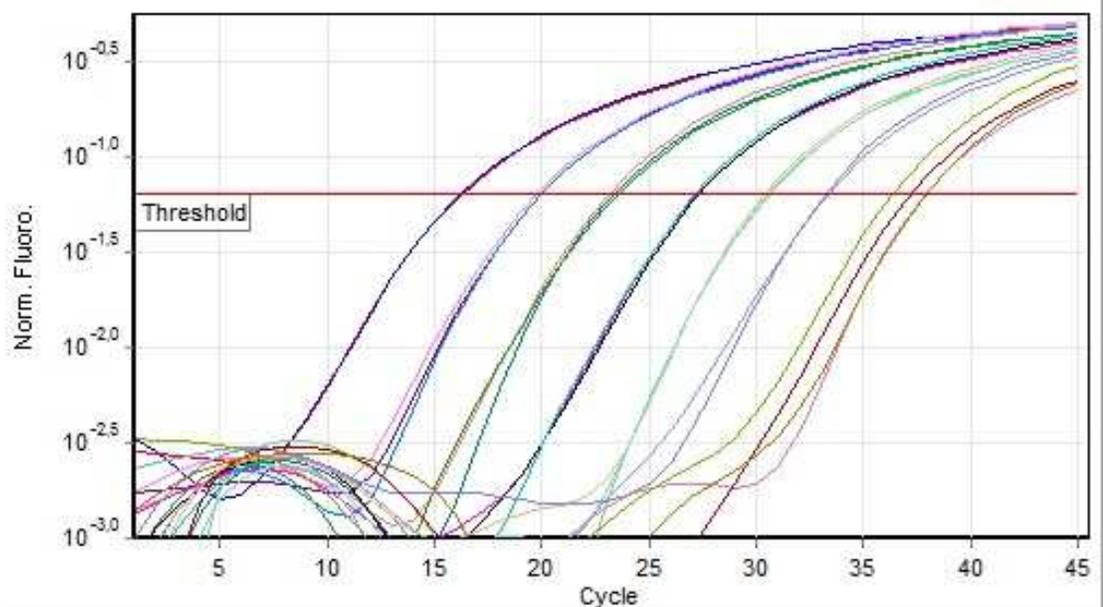


Figura 9. Representação gráfica dos pontos da curva padrão de qPCR. Amostras de DNA em diluições seriadas (10X) de sangue contaminado com cultura de *T. cruzi* (10^6 a 10^1 parasitos/mL) foram amplificadas em triplicata.

4.3.2. Quantificação absoluta das amostras por qPCR

A partir da curva padrão obtida, foram realizados os testes de qPCR das amostras incluídas no estudo (Figura 10). Em cada experimento, eram utilizadas duplicatas das amostras dos pacientes, de um ponto intermediário da curva padrão e do controle negativo. Em todos os experimentos, não se observou amplificação do NTC, garantindo que não houve contaminação dos reagentes utilizados.

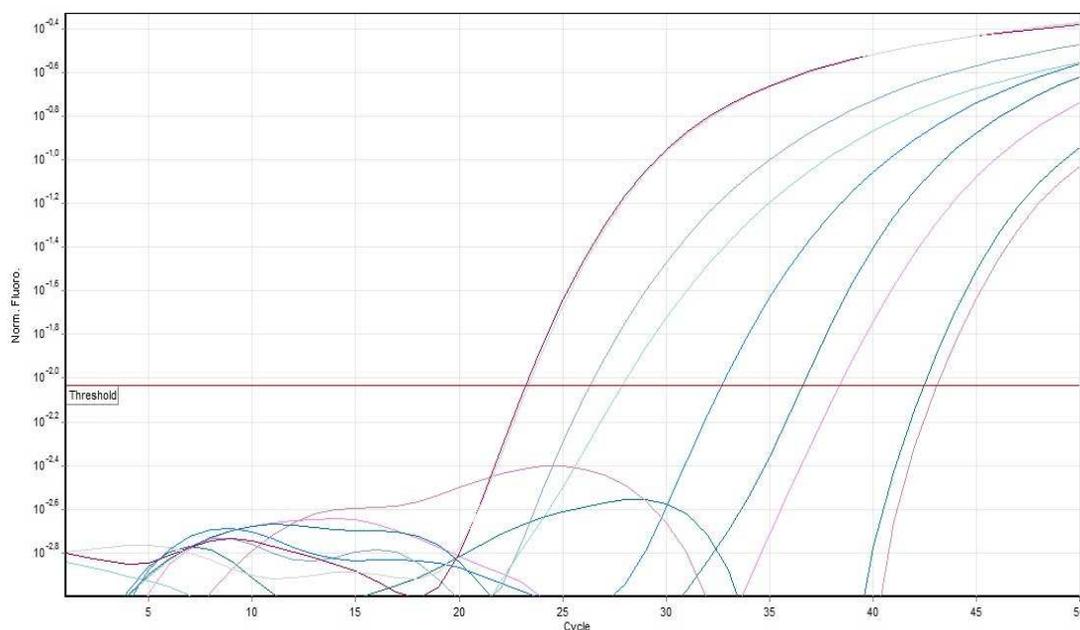


Figura 10. Representação dos dados de quantificação absoluta de amostras. Nos experimentos foi incluído um ponto intermediário da curva padrão e o NTC.

Para amostras do grupo I, o Ct médio observado foi 38,85. Em cinco amostras analisadas, não foi possível a detecção de Sat-DNA de *T. cruzi*. A média da carga parasitária foi 3,61 parasitos/mL. É importante ressaltar que em apenas duas amostras (amostras 2 e 23) a quantificação foi acima de 1 parasito/mL de sangue (Tabela 8).

Tabela 8. Quantificação absoluta por qPCR de amostras do grupo I.

	Paciente	Ct	Carga parasitária (parasitos/mL)
1	AFS	41,68	0,00316
2	AG	26,91	71,82
3	ANS	33,77	0,755
4	CLS	36,63	0,1067
5	CPSS	40,54	0,01
6	CRS	37,94	0,0419
7	GFS	42,23	0,0022
8	GJC	33,46	0,9673
9	GSA	40,98	0,0053
10	IGF	39,12	0,0162
11	JAP	ND	ND
12	JLR	42,69	0,0014
13	LBS	38,06	0,0384
14	MDSO	42,75	0,0013
15	MEJ	37,93	0,0421
16	NTS	ND	ND
17	NTE	ND	ND
18	OEM	44,66	0,0004
19	OSS	43,53	0,000868
20	OVP	40,48	0,00718
21	PCM	34,52	0,4091
22	RMNB	42,44	0,0017
23	RO	32,47	1,6903
24	SSS	ND	ND
25	TFA	ND	ND
26	TMR	43,21	0,001

Ct: ciclo de amplificação; ND: não detectado

Das 33 amostras de pacientes soropositivos para doença de Chagas (grupo II), o teste de quantificação foi realizado em 29 delas (Tabela 9). O Ct médio observado foi

39,10. Não foi possível a detecção de Sat-DNA de *T. cruzi* em 13 amostras, indicando parasitemia nula ou abaixo do limite de detecção do método.

Tabela 9. Quantificação absoluta por qPCR de amostras do grupo II.

	Paciente	Ct	Carga parasitária (parasitos/mL)
1	AADS	ND	ND
2	AGS	45,73	0,0002
3	AMCS	32,87	1,15
4	AOSP	40,35	0,007
5	APM	NR*	NR*
6	APS	45,6	0,0001
7	CCSL	ND	ND
8	CG	ND	ND
9	ECP	42,63	0,0014
10	ELR	29,65	2,14
11	EPSS	41,9	0,00271
12	ESS	ND	ND
13	HCS	ND	ND
14	IBR	36,39	0,122
15	JASP	ND	ND
16	JBS	NR*	NR*
17	JDO	ND	ND
18	JNQ	NR*	NR*
19	JNS	42,63	0,00162
20	LAM	43	0,00125
21	LLB	45,15	0,0003
22	MFFC	ND	ND
23	MFLA	27,15	76,9212
24	MVV	34	0,5687
25	NCS	37,3	0,05687
26	NGS	40,69	0,00619
27	NVS	NR*	NR*
28	OAP	ND	ND
29	OGM	ND	ND
30	OM	ND	ND
31	TTS	ND	ND
32	VRV	40,6	0,0066
33	ZOV	ND	ND

Ct: ciclo de amplificação; ND: não detectado; NR: não realizado;

NR*: não realizado por amostra insuficiente

Os Cts médios obtidos para os grupos I e II (38,85 e 39,10, respectivamente) foram bastante semelhantes, indicando amplificação tardia da sequência alvo de Sat-DNA de *T. cruzi*. Considerando que a quantificação absoluta foi acima de 1 parasito/mL em apenas cinco amostras estudadas, é possível reafirmar a parasitemia subpatente em indivíduos portadores de megaesôfago.

4.3.3. Correlação dos testes moleculares para detecção de Sat-DNA

A Tabela 10 sumariza os resultados obtidos pelos dois métodos moleculares utilizados para diagnóstico laboratorial neste estudo. Foi possível realizar a PCR qualitativa e a PCR quantitativa em 55 amostras dos grupos I e II (26 e 29 amostras, respectivamente). A correlação dos dados obtidos é pertinente uma vez que foi utilizado o mesmo alvo do Sat-DNA de *T. cruzi* nas reações de amplificação.

Tabela 10. Resultados de PCR qualitativa e qPCR para os grupos I e II.

	Paciente	Grupo	Sat-DNA	qPCR (parasitos/mL)
1	AFS	I	Negativa	0,00316
2	AG	I	Positiva	71,82
3	ANS	I	Positiva	0,755
4	CLS	I	Positiva	0,1067
5	CPSS	I	Negativa	0,01
6	CRS	I	Positiva	0,0419
7	GFS	I	Positiva	0,0022
8	GJC	I	Positiva	0,9673
9	GSA	I	Positiva	0,0053
10	IGF	I	Positiva	0,0162
11	JAP	I	Positiva	ND
12	JLR	I	Positiva	0,0014
13	LBS	I	Positiva	0,0384
14	MDSO	I	Positiva	0,0013
15	MEJ	I	Positiva	0,0421

16	NTS	I	Negativa	ND
17	NTE	I	Negativa	ND
18	OEM	I	Positiva	0,0004
19	OSS	I	Positiva	0,000868
20	OVP	I	Positiva	0,00718
21	PCM	I	Positiva	0,4091
22	RMNB	I	Positiva	0,0017
23	RO	I	Positiva	1,6903
24	SSS	I	Negativa	ND
25	TFA	I	Negativa	ND
26	TMR	I	Positiva	0,001
1	AADS	II	Negativa	ND
2	AGS	II	Positiva	0,0002
3	AMCS	II	Negativa	1,15
4	AOSP	II	Negativa	0,007
6	APS	II	Negativa	0,0001
7	CCSL	II	Negativa	ND
8	CG	II	Positiva	ND
9	ECP	II	Negativa	0,0014
10*	ELR	II	Positiva	2,14
11	EPSS	II	Positiva	0,00271
12	ESS	II	Negativa	ND
13*	HCS	II	Positiva	ND
14*	IBR	II	Positiva	0,122
15	JASP	II	Negativa	ND
17	JDO	II	Positiva	ND
19	JNS	II	Positiva	0,00162
20*	LAM	II	Positiva	0,00125
21*	LLB	II	Positiva	0,0003
22	MFFC	II	Negativa	ND
23	MFLA	II	Positiva	76,9212
24	MVV	II	Positiva	0,5687
25	NCS	II	Positiva	0,05687
26	NGS	II	Negativa	0,00619
28	OAP	II	Positiva	ND
29	OGM	II	Positiva	ND
30	OM	II	Positiva	ND
31	TTS	II	Negativa	ND
32	VRV	II	Positiva	0,0066
33	ZOV	II	Positiva	ND

* as amostras 10, 13, 14, 20 e 21 do grupo II apresentaram hemocultura positiva

Os índices de positividade dos testes qualitativo e quantitativo foram bem próximos quando consideramos o total de amostras positivas em ambos os grupos (Tabela 11).

Tabela 11. Positividade da PCR qualitativa e qPCR nos grupos I e II.

	Sat-DNA positiva	qPCR positiva
Grupo I (n=26)	20/26	21/26
Grupo II (n=29)	18/29	16/29
Total (n= 55)	38/55	37/55

Foi observada concordância entre os resultados de PCR qualitativa e qPCR em 40 das 55 amostras analisadas (72,72%), sendo que 30 amostras apresentaram resultados positivos para ambos os testes e as outras 10 amostras concordantes foram negativas para ambos os testes. Sendo assim, os métodos moleculares afastaram a possibilidade de infecção chagásica para quatro pacientes do grupo I (amostras 16, 17, 24 e 25). A presença de Sat-DNA de *T. cruzi* foi detectada em 19/26 amostras (73%) do grupo I por ambos os métodos, o que sugere infecção chagásica nos pacientes com sorologia inconclusiva ou não reagente.

Oito amostras positivas por PCR qualitativa não puderam ser quantificadas e para outras sete amostras com PCR qualitativa negativa, foi possível a quantificação de DNA de *T. cruzi*. A maior parte dos resultados discordantes (12/15) foi observada no grupo II.

A concordância entre os cinco casos de hemocultura positiva do grupo II e a PCR qualitativa foi 100%. Entretanto, para a amostra 13, positiva por hemocultura e por PCR qualitativa, não se observou detecção pelo método quantitativo, o que indica limitação do

teste ou falta de homogeneidade da amostra. Neste caso específico, as reações de qPCR foram repetidas diversas vezes para confirmação do resultado.

5. DISCUSSÃO

Descrita pioneiramente por Carlos Chagas há mais de um século, a doença de Chagas ainda representa um desafio para pesquisadores e clínicos devido a sua complexidade. Com baixas taxas de cura na fase crônica e sem vacina disponível, esta enfermidade é responsável por cerca de 12 mil mortes/ano na região da América Latina. O diagnóstico baseado em técnicas de biologia molecular vem sendo aperfeiçoado ao longo das últimas décadas e tem se mostrado especialmente útil em situações de reativação da infecção chagásica e no monitoramento terapêutico.

Neste trabalho, foi otimizado um protocolo de qPCR baseado no sistema TaqMan® para quantificação de Sat-DNA de *T. cruzi* em amostras de sangue, utilizando como referência o protocolo de Piron et al, 2007. Simultaneamente, empregamos métodos qualitativos para detecção de DNA de *T. cruzi*, capazes de indicar presença ou ausência de material genético do parasito na amostra estudada.

Os pacientes incluídos no estudo apresentavam megaesôfago como marcador clínico. Salientamos que, em nosso país, o megaesôfago idiopático é pouco frequente, sendo a doença de Chagas sua causa mais comum (Dantas, 2003). Estudo anterior avaliando a soroprevalência para doença de Chagas na mesma população incluída no presente estudo, revelou que 79% dos portadores de megaesôfago atendidos no Hospital de Clínicas/UNICAMP, entre 1999 e 2007, tinham sorologia convencional positiva para doença de Chagas (Batista, 2010).

Com o objetivo de analisar o comportamento dos métodos moleculares para fins diagnósticos em uma população com megaesôfago, os pacientes foram divididos em dois

grupos: 26 indivíduos com sorologia convencional não reagente e/ou inconclusiva (grupo I) e 33 com sorologia convencional positiva para doença de Chagas (grupo II).

Com o objetivo de avaliar comparativamente o desempenho da PCR qualitativa para os dois alvos mais empregados para diagnóstico molecular da doença de Chagas, foram utilizados protocolos para detecção de fragmentos do Sat-DNA e do kDNA, que se encontram em quantidades consideravelmente abundantes no genoma de *T. cruzi*. Para os dois grupos de pacientes, o Sat-DNA mostrou-se um alvo mais adequado para fins diagnósticos. O limite de detecção apresentado pela PCR qualitativa para Sat-DNA de *T. cruzi* foi de 1 parasito/mL de sangue. É interessante observar que a positividade do método foi menor no grupo de pacientes soropositivos do que no grupo de pacientes sem confirmação sorológica. Possivelmente, obtivemos resultados falso-negativos de PCR qualitativa, o que poderia se justificar pela parasitemia baixa e intermitente na fase crônica da doença de Chagas; entretanto, é necessário ampliar a casuística de ambos os grupos para que este dado seja confirmado.

Considerando os pacientes com PCR positiva para Sat-DNA, 20 (nove soronegativos e 11 com sorologia inconclusiva) apresentavam antecedentes epidemiológicos para doença de Chagas, seja por nascimento em área endêmica, conhecimento e/ou contato com o triatomíneo ou familiares portadores da doença. Em conjunto, o resultado do teste molecular e a epidemiologia fortemente positiva, revelam a etiologia chagásica do megaeosôfago nestes pacientes e abrem questionamentos quanto ao subdiagnóstico e manejo clínico em situações de não confirmação da infecção chagásica por métodos sorológicos convencionais.

As mesmas amostras de DNA utilizadas para os testes qualitativos, foram testados por um método de quantificação absoluta em tempo real. A curva padrão utilizada no estudo de referência (Piron et al, 2007) apresentava linearidade entre os pontos 10^5 a 10^1 . Em estudo recente de Moreira et al (2013), o mesmo protocolo gerou uma curva padrão com linearidade entre 10^5 a 10^0 parasitos/mL. A partir da otimização do protocolo em nosso estudo, foi possível obter linearidade com sete pontos (10^6 a 10^0 parasitos/mL), o que ampliou o limite máximo e mínimo de quantificação das amostras em relação ao protocolo de referência.

Das 26 amostras quantificadas no grupo I, em apenas duas delas (amostras 2 e 23) a quantificação foi acima de 1 parasito/mL de sangue. Os baixos níveis de parasitemia eram esperados, já que se trata de um grupo de pacientes crônicos com sorologia não reagente ou inconclusiva para doença de Chagas.

Neste estudo, a média da carga parasitária do grupo II foi de 5,06 parasitos/mL. Em relato de Moreira et al (2013), esta média em pacientes crônicos com cardiopatia chagásica e soropositivos para doença de Chagas foi 0,1 parasito/mL. Os autores avaliaram a parasitemia em amostras de 50 pacientes brasileiros, sendo que, em 31 delas (62%), foi detectado Sat-DNA de *T. cruzi* por qPCR. Em nosso estudo, no grupo de pacientes crônicos soropositivos para doença de Chagas e com forma digestiva, a detecção de DNA por qPCR foi possível em 16/29 pacientes, o que leva a uma positividade de 55,1% .

Foi observada concordância entre os resultados de PCR qualitativa e qPCR em 40 das 55 amostras analisadas (72,72%), sendo que 10 amostras apresentaram resultados negativos para ambos os testes. Sendo assim, os métodos moleculares afastaram a

possibilidade de infecção chagásica para quatro pacientes do grupo I (amostras 16, 17, 24 e 25). A presença de Sat-DNA foi detectada em 19/26 amostras (73%) do grupo I por ambos os métodos, o que sugere infecção chagásica nos pacientes com sorologia inconclusiva ou não reagente. Houve discordância da PCR qualitativa e qPCR em três casos (amostras 1, 5 e 11) neste grupo.

Oito amostras positivas por PCR qualitativa não puderam ser quantificadas e para outras sete amostras com PCR qualitativa negativa, foi possível a quantificação de DNA de *T. cruzi*. A maior parte dos resultados discordantes (12/15) foi observada no grupo II. Este é um dado bastante interessante uma vez que, em se tratando de pacientes soropositivos para doença de Chagas, esperava-se que os métodos moleculares apresentassem resultados concordantes com os de métodos sorológicos convencionais.

A concordância entre os cinco casos de hemocultura positiva do grupo II e a PCR qualitativa foi 100%. Entretanto, para a amostra 13, positiva por hemocultura e por PCR qualitativa, a qPCR foi negativa. Este dado sugere limitação do teste e/ou quantidades variáveis de DNA do parasito no volume da amostra. Embora o procedimento tenha sido repetido diversas vezes a fim de confirmar o resultado, não foi possível quantificar DNA de *T. cruzi* nesta amostra.

É importante observar que apenas uma das amostras com hemocultura positiva (amostra 10) apresentou quantificação acima de 1 parasito/mL. Este dado reforça a hipótese de falta de homogeneidade da amostra, ou seja, possivelmente o volume de sangue coletado para hemocultura continha um número superior de parasitos à amostra utilizada para os

testes moleculares. Apesar de a coleta de sangue ter sido feita em um momento único, esta é uma possível explicação para a discordância de resultados.

Considerando que não existe protocolo validado para detecção/quantificação de DNA de *T. cruzi* e ainda não há um teste disponível comercialmente, a diversidade dos métodos qualitativos e quantitativos utilizados pelos centros de pesquisa tem gerado resultados controversos que são interpretados individualmente por cada equipe médica que tem acesso a estes dados. Salientamos que o protocolo utilizado em nosso estudo está de acordo com um dos quatro protocolos apresentados por Schijman et al (2011), que tiveram melhor sensibilidade, especificidade e acurácia quando comparados a testes de laboratórios do mundo inteiro.

Entendemos que ainda há muito a ser aperfeiçoado para que se possam estabelecer parâmetros para o diagnóstico molecular da doença de Chagas. Desde o volume de sangue utilizado e sistematização da coleta, método de isolamento do DNA genômico até a padronização dos reagentes e fatores inerentes à técnica em si, são elementos que, combinados à variabilidade genética do próprio parasito e à heterogeneidade da população estudada, levam a resultados bastante variados.

Em se tratando especificamente do emprego de testes moleculares para fins diagnósticos em pacientes crônicos, a qPCR apresenta como vantagens a diminuição de resultados falso-positivos, uma vez que há menor manipulação das amostras e é possível utilizar reagentes que previnem a amplificação de produtos pré-amplificados, sendo gerados resultados em menor tempo quando comparada à PCR qualitativa. Entretanto, os métodos qualitativos ainda apresentam um custo menos elevado e cumprem

satisfatoriamente a função diagnóstica quando não há necessidade de quantificação da carga parasitária. Há de se reafirmar que ambos os métodos ainda estão sendo aperfeiçoados em busca de um protocolo consenso para utilização tanto em ambiente de pesquisa quanto em rotina de serviços de saúde.

É evidente o potencial das técnicas moleculares e as possibilidades de suas aplicações, mas sua implementação como método diagnóstico para a doença de Chagas e seu impacto prático ainda são assuntos tratados com reserva nas reuniões e encontros científicos.

6. CONCLUSÃO

- Sat-DNA é o alvo mais adequado a ser utilizado na PCR qualitativa, pois apresentou positividade superior à do kDNA nos grupos I e II.

- Considerando o Sat-DNA como alvo, os testes de PCR qualitativa e qPCR mostraram concordância de 72,72% entre si. Este dado nos permite concluir que, apesar do aperfeiçoamento das técnicas moleculares, ainda existe uma limitação importante a ser considerada. Um protocolo consenso deve ser estabelecido a fim de assegurar a homogeneidade dos resultados obtidos por estudos distintos.

- A carga parasitária das amostras dos grupos I e II apresentou-se muito baixa, com exceção da amostra 2 do grupo I e da amostra 23 do grupo II. Desse modo, não foi possível estabelecer uma correlação entre a parasitemia e o status sorológico dos pacientes.

- Para fins diagnósticos (incluindo o esclarecimento da etiologia do megaesôfago), a PCR qualitativa mostra-se adequada, pois apresenta bom desempenho e menor custo em relação à qPCR. O uso de métodos moleculares quantitativos deve ser reservado a situações em que a quantificação parasitária é estritamente necessária, como por exemplo, na avaliação terapêutica e na reativação da doença de Chagas em casos de imunossupressão.

- O desempenho da hemocultura e das técnicas moleculares pode ser melhorado com a sistematização da coleta de sangue dos pacientes em períodos de tempo

pré-determinados, o que pode levar ao aumento de positividade nas amostras de chagásicos crônicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersson J. Molecular diagnosis of experimental Chagas' disease. *Trends Parasitol.* 2004 Feb;20(2):52-3.

Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 May;60(5):726-32.

Ávila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave 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.* 1993 Sep;31(9):2421-6.

Batista AM, Aguiar C, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, Costa SCB. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. *Int J Infect Dis.* 2010 Nov;14(11):e974-7.

Brénière SF, Poch O, Selaes H, Tibayrenc M, Lemesre JP, Antezana G, Desjeux P. Specific humoral depression in chronic patients infected by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1984 Sep-Oct; 26(5):254-8.

Brénière SF, Carrasco R, Antezana G, Desjeux P, Tibayrenc M. Association between *Trypanosoma cruzi* zymodemes and specific humoral depression in chronic chagasic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;83:517.

Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993;88(1):171-2.

Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Borges Pereira J, Coura JR, Morel CM, Wincker P. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol*. 1995;81:462-71.

Britto C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(1):122-35.

Brumpt E. O xenodiagnóstico. Aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e, em particular, à tripanosomose de Chagas. *An Paul Med Cirurg*. 1914;3: 97-102.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LM. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2002 Oct;88(10):894-900.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2007 Feb 23;56(7):141-3.

Chagas C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909 Ago;1(2):159-218.

Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari, CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev Bras Med Trop.* 1989 Jan-Mar;22(1):19-23.

Chiari E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:299-300.

Chiler TM, Samudio, MA, Zouler, G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas disease and leishmaniasis. *Am J Trop Hyg.* 1990 Dec;43(6):650-6.

Cimerman B, Cimerman, S. *Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais.* 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 390 p.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:113-22.

Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104 Suppl 1:31-40.

Crema E, Cruvinel LAF, Werneck AM, Oliveira RM, Silva AA. Correlação manométrico-radiológica e sua importância no tratamento cirúrgico do megaesôfago chagásico. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 36(6):665-9.

Cunha-Neto E, Gruber A, Zingales B, Kalil J. Estudo da doença de Chagas: abordagem molecular. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 1995 5(2):217-29.

Dantas RO. Comparação entre acalásia idiopática e acalásia consequente à doença de Chagas: revisão de publicações sobre o tema. *Arq Gastroenterol.* 2003 40(2):126-30.

De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol*. 1984;86:197-283.

De Souza W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:17-36.

Del Puerto R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C et al. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 May 18;4(5).

Dias JCP, Coura JR. Epidemiologia. In: Dias JCP, Coura JR (orgs). *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral*. 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997.

Dias JCP, Schofield CJ. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998 Ago 31(4):373-83.

Diez C, Manattini MS, Zanuttini JC, Marcipart A. PCR (reacción en cadena de la polimerasa) em Chagas neonatal: una alternativa para el diagnostico precoz? *Medicina (Buenos Aires)*, 1998 58:436-7.

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):e419.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005 Jul 15;309(5733):409-15.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using miniexon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Jun;58(6):807-11.

Ferreira A, Ávila SLM. Laboratory diagnosis of Chagas' heart disease. *Sao Paulo Med J.* 1995 Mar-Apr;113(2):767-71.

Ferreira MS, Lopes ER, Chapadeiro E, Dias JCP, Luquetti AO. Doença de Chagas. *Tratado de Infectologia.* Veronesi R, Focaccia R (eds). São Paulo: Ed. Atheneu, 1996.

Ferreira AW, Belem ZR, Lemos EA, Reed SG, Campos-Neto A. 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.* 2001 Dec;39(12):4390-5.

FIOCRUZ – Fundação do Instituto Oswaldo Cruz. Centenário da Descoberta da Doença de Chagas. Disponível em: <[http:// www.fiocruz.br/chagas/](http://www.fiocruz.br/chagas/)>. Acesso em: nov. 2012.

Freitas VL, da Silva SC, Sartori AM, Bezerra RC, Westphalen EV, Molina TD et al. Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Aug;5(8):e1277.

FUNASA - Fundação Nacional da Saúde. Tratamento etiológico da doença de Chagas. Gerência técnica da doença de Chagas. 2ed. Brasília, 1997, p.32.

Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Feb;60(2):205-10.

Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizardi PM. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 Jun;81(11):3356-60.

Jackson Y, Myers C, Diana A, Marti HP, Wolff H, Chappuis F et al. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):601-3.

Junqueira AC, Chiari E, Wincker P. Comparison of polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in a endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996 Mar-Apr;90(2):129-32.

Kamiji MM, Oliveira RB. Features of Chagas' disease patients with emphasis on digestive form, in a tertiary hospital of Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(4):305-9.

Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol.* 1996;34:1171- 5.

Köberle F & Nador E. Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. *Rev Paul Med.* 1955 Dec;47(6):643-61.

Lages-Silva E, Crema E, Ramirez LE, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Nov;65(5):435-41.

Lescure FX, Canestri A, Melliez H, Jauréguiberry S, Develoux M, Dorent R et al. Chagas disease, France. *Emerg Infect Dis.* 2008 Apr;14(4):644-6.

Luquetti AO. Megaesôfago e anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev Goiana Med.* 1987 33:1-16.

Luz ZMP. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:295-8.

Machado-de-Assis GF, GA Diniz, Montoya RA, Dias JC, Coura JR, Machado-Coelho GL 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 Nov;108(7):873-80.

Maldonado C, Albano S, Vettorazzi L, Salomone O, Zlocowski JC, Abiega C et al. 2004. Using polymerase chain reaction in early diagnosis of re-activated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. *J Heart Lung Transpl.* 2004 Dec;23(12):1345-8.

Malta J. *Doença de Chagas.* São Paulo: Sarvier, 1996. 202pp.

Manoel-Caetano Fda S, Carareto CM, Borim AA, Miyazaki K, Silva AE. kDNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* in blood and oesophageal mucosa from chronic chagasic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Nov;102(11):1102-7. Epub 2008 Jul 9.

Marcon GE, Andrade PD, de Albuquerque DM, Wanderley Jda S, de Almeida EA, Guariento ME, Costa SC. 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. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002 May;43(1):39-43.

Maslov DA, Podlipaev SA, Lukes J. Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(3):397-402.

Mendes RP, Hoshino-Shimizu S, Moura da Silva AM, Mota I, Heredia RA, Luquetti AO, Leser PG. Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol.* 1997 Jul;35(7):1829-34.

Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977;71(3):217-25.

Miles MA, Lanham SM, de Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74(2):221-37.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2005;38 Supl. III:12-4.

Moncayo A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;1:401-4.

Moncayo A & Yanine, MIO. An update on Chagas' disease (human American trypanosomiasis). Ann Trop Med Parasitol. 2006 Dec;100(8):663-77.

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. Int J Syst Evol Microbiol. 2004 Sep;54(Pt 5):1861-75.

Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MF, 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;125:23-31.

Morel C, Chiari E, Plessmann Camargo E, Mattei Dm, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of Kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci USA. 1980 Nov;77(11):6810-4.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989 Jul;27(7):1477-82.

MSF (Médecins Sans Frontières). International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop. 2008 May-Jun;41(3):315-9.

Muñoz J, Gómez i Prat J, Gállego M, Gimeno F, Treviño B, López-Chejade P, Ribera O, Molina L, Sanz S, Pinazo MJ, Riera C, Posada EJ, Sanz G, Portús M, Gascon J. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop*. 2009 Jul;111(1):51-5. Epub 2009 Mar 5.

Neves DP. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494pp.

Ochs DE, Hnilica VC, Moser DR, Smith JH, Kirchhoff LV. Post mortem diagnosis of autochthonous acute chagasic myocarditis by polymerase chain reaction amplification of a species-specific DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54(5):526-29.

Olivares-Villagómez D, McCurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Oct;59(4):563-70.

PAHO (Pan American Health Organization). Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr>>. Acesso em: 8 out. 2008.

Peñaranda-Carrillo R, Castro C, Rezende J, Prata A, Macêdo V. Radiographic study of the oesophagus of chagasic patients in 25 years of the Mambáí Project. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 Mar-Apr;39(2):152-5.

Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Gómez i Prat J, Portús M, Sauleda S. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007 Sep;103(3):195-200. Epub 2007 Jun 23.

Portela-Lindoso AA & Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saude Publica*. 2003 Feb;37(1):107-15.

Prata A. A classificação da infecção chagásica no homem. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1984;14:392-9.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001 Sep;1(2):92-100.

Rassi A, Rassi Júnior A, Gabriel Rassi SG. Fase Aguda. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (orgs). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Rey L. *Parasitologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1991. 856pp.

Rezende J, Lauer KM, de Oliveira A. Clinical and radiological aspects of aperistalsis of the esophagus. *Rev Bras Gastroenterol*. 1960 Sep-Dec;12:247-62.

Rezende & Moreira, In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (orgs). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Ribeiro ALP & Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31: 301-14.

Russomando G, Figueredo A, Almirón M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol.* 1992 Nov;30(11):2864-8.

Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Sep;59(3):487-91.

Saéz-Alquézar A, Otani MM, Sabino EC, Ribeiro-dos-Santos G, Salles N, Chamone DF. Evaluation of the performance of Brazilian blood banks in testing for Chagas' disease. *Vox Sang.* 1998;74(4):228-31.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230:1350-4.

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.* 1988 Jan 29;239(4839):487-91.

Sales-Campos H, Kappel HB, Andrade CP, Lima TP, Mattos ME, de Castilho A et al. A DTU-dependent blood parasitism and a DTU-independent tissue parasitism during mixed infection of *Trypanosoma cruzi* in immunosuppressed mice. *Parasitol Res.* 2013 Nov 1 [Epub ahead of print].

Salomone AO, Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Reyes ME, Omelianuk M et al. Trypanosoma cruzi in persons without serologic evidence of disease. Emerg Infect Dis. 2003 Dec;9(12):1558-62.

Sanchez-Lermen R de L, Dick E, Salas, JA, Fontes, CJ. Upper gastrointestinal symptoms and esophageal motility disorders in indeterminate Chagas disease patients. Rev Soc Bras Med Trop. 2007 Mar-Apr;40(2):197-203.

Santos Júnior JCM. Megacólon – parte II: doença de Chagas. Rev Bras Coloproct, 2002(4):266-77.

Schmunis GA. Prevention of transfusional Trypanosoma cruzi infection in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:93-101.

Schmunis GA. A Tripanossomíase Americana e seu impacto na Saúde Pública das Américas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (orgs). Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Schijman AG et al. International study to evaluate PCR methods for detection of Trypanosoma cruzi DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jan 11;5(1):e931.

Schofield CJ & Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. Adv Parasitol. 1999;42:1-27.

Shikanai-Yasuda MA, Ochs DE, Tolezano JE, Kirchhoff LV. Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996 Nov-Dec;90(6):649-51.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Dec 20;83(2):141-52.

Souza-Lima RC, Barbosa MD, Coura JR, Arcanjo AR, Nascimento AS, Ferreira JM et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013 Jul-Aug;46(4):510-4.

Sturm NR, Degraeve 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.* 1989 Mar 15;33(3):205-14.

Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gürtler RE. The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med.* 2007 Dec;4(12):e332.

Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol.* 1998;28:85-104.

Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henriquez D et al. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J Clin Microbiol.* 2004 Jan;42(1):449-52.

Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*. 1996 Sep 28;348(9031):891-2.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000 May;156(5):1805-9.

Vaidian AK, Weiss LM, Tanowitz HB. Chagas' disease and AIDS. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2004 May 13;3(1):2.

Vera-Cruz JM, Magallón-Gastelum E, Grijalva G, Rincón AR, Ramos-García C, Armendáriz-Borunda J. Molecular diagnosis of Chagas disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitol Res*. 2003; 89(6):480-6.

Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 May;68(5):574-82.

Wanderley DM, Gonzales TT, Pereira MS, Nascimento RD, Moraes-Souza H. Control of hemotherapy and transfusional Chagas disease: 1988 and 1990. *Rev Saude Publica*. 1993 Dec;27(6):430-5.

Wendel S. Doença de Chagas Transfusional. In: Dias, JCP, Coura, JR (orgs). *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral*. 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997.

Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM et al. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Lett.* 1994 Dec 15;124(3):419-23.

World Health Organization. Control of Chagas disease. WHO Tech. Rep. Ser. 811. Second report of the WHO Expert Committee, Geneva. 1991.

World Health Organization. Control of Chagas disease. WHO Tech. Rep. Ser. 811. Second report of the WHO Expert Committee, Geneva. 2002.

World Health Organization. Chagas disease: control and elimination. WHO Report of the Secretariat to the Executive Board, 124th Session. 2008.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, 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.* 2009 Jan;104(7):1051-4.