

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES**

Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

CÍNTIA NASCIMENTO DA COSTA OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA CARACTERIZAÇÃO DOS
PACIENTES ENVOLVIDOS NO SURTO DE DOENÇA DE CHAGAS EM
PERNAMBUCO**

RECIFE

2020

CÍNTIA NASCIMENTO DA COSTA OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA CARACTERIZAÇÃO DOS
PACIENTES ENVOLVIDOS NO SURTO DE DOENÇA DE CHAGAS EM
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

Coorientadora: Dra. Milena de Paiva Cavalcanti

RECIFE

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

O48a	<p>Oliveira, Cíntia Nascimento da Costa. Aplicação do diagnóstico molecular para caracterização dos pacientes envolvidos no surto de doença de Chagas em Pernambuco / Cíntia Nascimento da Costa. – Recife: [s.n.], 2020. 82 p.: il, graf., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020. Orientadora: Virginia Maria Barros de Lorena; coorientadora: Milena de Paiva Cavalcanti.</p> <p>1. Doença de Chagas. 2. Diagnóstico. 3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real - métodos. 4. Brasil. I. Lorena, Virginia Maria Barros de. II. Cavalcanti, Milena de Paiva. III. Título..</p> <p style="text-align: right;">CDU 578</p>	
------	---	--

CÍNTIA NASCIMENTO DA COSTA OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA CARACTERIZAÇÃO DOS
PACIENTES ENVOLVIDOS NO SURTO DE DOENÇA DE CHAGAS EM
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 20/02/2020

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Taciana Mirely Maciel Higino

Departamento de Investigação Científica/Fundação Altino Ventura

Dr. Fábio Lopes de Melo

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Ana Karine de Araújo Soares

Departamento de Investigação Científica/Fundação Altino Ventura

Dra. Virginia Maria Barros de Lorena (Orientadora)

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

A todos aqueles acometidos por essa
enfermidade, especialmente aos mais humildes,
sem voz e sem vez.

AGRADECIMENTOS

Há tanto para agradecer...

A Deus por ter me permitido viver essa experiência. A minha Mãe Maria Santíssima, que não tenho dúvidas do quanto intercedeu por mim.

As minhas orientadoras, Virginia e Milena, por cada palavra, estímulo, correção e por sempre me estimularem e acreditarem em meu trabalho. Excelentes profissionais, que mostram que é possível fazer ciência de maneira humana, ética e prazerosa.

Aos queridos amigos de trabalho, de laboratório, de disciplinas que tornam mais leve e empolgante a dedicação à pesquisa científica. Especialmente ao Grupo ChagasLeishOseHIV.

Aos amigos de longa data, daquele outro grupo: Ray, Rômulo, Suênia, Gilsan, Tayná, Lays, Victinho e Gabi, sempre dispostos a ajudar, a lanchar, a chorar e a descontraír, com total dedicação e amor! Vocês são presentes dos céus!

Ao Grupinho Chagas: Mih, Kamila, Leylla, Diego, Bella, Tiago, Amandinha, Claudeir, José, Ana... pelas reuniões, risadas, descontração e crescimento.

A Mineo, com sua leveza e calma, sempre disposto a ajudar.

A Maria Gabriela, minha técnica (piada interna!), que tão importante tem sido nas atividades do surto, por sua dedicação e ajuda.

Aos amigos de vida, meus amados Antigos! Aos Não-Masters, com nossas saídas e conversas sempre maravilhosas. Ben e Kate, meu casal amado, com todas as caronas e comidas, e pelo seu sofá S2. May e Chico, nos risos e dores, na catequese e pra vida! Ing, cumadhy e amiga! Ao Anjo amigo: a saudade dói, mas a certeza conforta!

Aos amigos de infância, da época de escola, àqueles da FAFIRE. E, especialmente, as minhas queridas Line (Thutu e My Little) e Van: mais que amigas! Grata pelo incentivo e amor de vocês!!

A minha família. Meus pais, motivo de força e orgulho! Minha irmã, minha maior babona e incentivadora! Minha sogra, que é mãe e que cuida! Aos meus tios e primos/irmãos, pela presença e ajuda! E, excepcionalmente, meu marido e filho: base, força, amor, gás, prioridade...VIDA! Nenhuma palavra é suficiente para definir vocês!

Ao SRDC, pelo financiamento nos insumos para atendimento aos expostos ao surto de Chagas.

Ao IAM, por toda infraestrutura.

A todos que formam o Aggeu, seus funcionários, desde a recepção à direção.

Não posso deixar de agradecer a todas as pessoas expostas ao surto de Chagas de 2019, por sua contribuição e resiliência. Bem como aos demais profissionais envolvidos, que com união e colaboração fizeram um lindo trabalho para enfretamento da situação.

“Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que faz arte em defesa da vida” (Carlos Chagas).

OLIVEIRA, Cíntia Nascimento da Costa. **Aplicação do diagnóstico molecular para caracterização dos pacientes envolvidos no surto de doença de Chagas em Pernambuco.** 2020. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

RESUMO

O presente trabalho avaliou a aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para diagnóstico da doença de Chagas (DC) aguda em amostras de 77 indivíduos expostos ao surto ocorrido em Pernambuco, relacionando os resultados obtidos aos dos métodos diagnósticos para esta fase da infecção. Inicialmente realizou-se o desenvolvimento de sistemas de *primers* para o DNA do cinetoplasto (kDNA) e nuclear (SAT-DNA) de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), e avaliação dos sistemas TCZ (MOSER et al., 1989) e *Cruzi* (PÍRON et al., 2007), preditos na literatura. Os sistemas TcB-IAM e CzB-IAM foram desenhados para o kDNA e, para o SAT-DNA, o TcSAT-IAM. O TcSAT-IAM e o *Cruzi* apresentaram limite de detecção de 1fg do DNA alvo. Segundo critérios da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (SES/PE), 39 casos foram registrados, sendo 28 pelo critério laboratorial e 11 pelo clínico-epidemiológico. Amostras de sangue dos 77 indivíduos foram submetidas à qPCR por ambos sistemas, alcançando concordância de 89,61% entre eles. Após análises entre sistemas e critérios da SES/PE, o TcSAT-IAM apresentou sensibilidade e especificidade de 53,85% (IC 38,57-68,43) e 94,74% (IC 82,71- 98,54), respectivamente, acurácia de 74% e concordância moderada; para o sistema *Cruzi* a sensibilidade e a especificidade foram de 48,72% (IC 33,86-63,8) e 89,47% (IC 75,87-95,83), respectivamente, com acurácia de 68,83%, tendo concordância razoável. O sistema TcSAT-IAM apresentou acurácia de 72,58% e 75% em relação aos testes parasitológicos e sorológicos (IgM anti-*T. cruzi*), respectivamente. Todos os casos foram acompanhados pelo TcSAT-IAM em 3 coletas pós-tratamento, demonstrando negativação da carga parasitária. Os dados demonstram a importância da coleta amostral prévia ao tratamento e do desenvolvimento de um padrão-ouro composto, no qual os dados da qPCR sejam considerados junto aos dos testes parasitológicos e sorológicos. Destaca-se a relevância da técnica molecular para um diagnóstico rápido e preciso.

Palavras Chaves: Doença de Chagas. Diagnóstico. PCR em tempo real.

OLIVEIRA, Cíntia Nascimento da Costa. **Molecular diagnosis application for characterization of patients involved in Chagas disease outbreak in Pernambuco**. 2020. Dissertation (MSc in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife.

ABSTRACT

The present work uses the applicability of the real-time PCR technique (qPCR) for the diagnosis of Chagas disease (CD), acute in tests of 77 individuals exposed to the outbreak that occurred in Pernambuco, relating the results of the diagnostic methods for this phase of infection. Initially, the development of kinetoplast (kDNA) and nuclear (SAT-DNA) primer systems for *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), and evaluation of the TCZ (MOSER et al., 1989) and Cruzi (PÍRON et al., 2007) systems, predicted in the literature. The TcB-IAM and CzB-IAM systems were developed for kDNA and, for SAT-DNA, or TcSAT-IAM. TcSAT-IAM and Cruzi a detection limit of 1fg of the DNA target. As classified by the Pernambuco State Health Secretariat (SES/PE), 39 cases were recorded, 28 of which by laboratory criteria and 11 by clinical and epidemiological criteria. Blood samples from 77 individuals were submitted to qPCR by both systems, reaching an agreement of 89.61% between them. After the analysis between the systems and the requirements of the SES/PE, the TcSAT-IAM showed sensitivity and specificity of 53.85% (CI 38.57-68.43) and 94.74% (CI 82.71- 98.54), respectively, 74% accuracy and moderate agreement; for the Cruzi system with sensitivity and specificity of 48.72% (CI 33.86-63.8) and 89.47% (CI 75.87-95.83), respectively, with an accuracy of 68.83%, having reasonable agreement. The TcSAT-IAM system has an accuracy of 72.58% and 75% in relation to parasitological and serological tests (IgM anti-*T. cruzi*), respectively. All cases were monitored by TcSAT-IAM in 3 post-treatment samples, showing a negative parasitic load. The data demonstrate an important collection of previous sample for treatment and development of a compound gold standard, without the qPCR data that are considered together with parasitological and serological tests. Determine the relevance of molecular technique for a quick and accurate diagnosis.

Key words: Diagnosis. Chagas' disease. Real-time PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenho esquemático demonstrando a organização estrutural intracelular de forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	18
Figura 2 -	Desenhos esquemáticos das formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	19
Figura 3 -	Desenho esquemático do ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> no inseto vetor e no mamífero hospedeiro.	21
Figura 4 -	Distribuição dos casos de doença de Chagas aguda, segundo município de residência e ano de notificação, 2012 a 2016.	24
Figura 5 -	Evolução parasitológica e sorológica nas fases aguda e crônica da doença de Chagas	26
Figura 6 -	Mapa do Estado de Pernambuco com destaque para o município de Ibimirim	32
Figura 7 -	Fluxograma ilustrando os critérios para classificação dos resultados a serem descritos nos laudos de pesquisa disponibilizados aos médicos quanto aos resultados das qPCRs de amostras dos indivíduos expostos ao surto de doença de Chagas	42
Figura 8 -	Alinhamento múltiplo de sequências de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania</i> spp. por meio do <i>software</i> Mega (versão 7.1)	45
Figura 9 -	Alinhamento de múltiplas sequências do kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> , por meio do <i>software</i> Mega (versão 7.1).	46
Figura 10 -	Alinhamento de múltiplas sequências do kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> , por meio do <i>software</i> Mega (versão 7.1).	46
Figura 11 -	Alinhamento de múltiplas sequências do SAT-DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> , por meio do <i>software</i> Mega (versão 7.1).	46
Figura 12 -	Curva de amplificação do teste de especificidade para o sistema TcSAT-IAM.	49

Figura 13 - Curva de <i>melting</i> do teste de especificidade para o sistema TcSAT-IAM.	50
Figura 14 - Curva de amplificação para o teste de especificidade para o sistema Cruzi.	51
Figura 15 - Curva de <i>melting</i> para o teste de especificidade para o sistema Cruzi.	52
Figura 16 - Fluxograma ilustrando o diagnóstico dos indivíduos expostos ao surto de doença de Chagas, considerando critérios diagnósticos adotados pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco.	53

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Sistemas de *primers* preditos na literatura testados para detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*. 39
- Quadro 2** - Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença. 43
- Quadro 3** - Sistemas de *primers* desenhados para detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*. 47
- Quadro 4** - Sintomatologia notificada e classificação dos pacientes dentre os critérios Laboratorial e Clínico-epidemiológico pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco. 54
- Quadro 5** - Análise de concordância dos resultados de pacientes classificados pelo critério laboratorial com amostras coletadas para PCR em tempo real antes ou até 3 dias pós-início de tratamento etiológico para doença de Chagas. 56
- Quadro 6** - Análise dos resultados de pacientes classificados pelo critério clínico-epidemiológico com amostra coletadas para PCR em tempo real e informações quanto ao tratamento etiológico para doença de Chagas 57
- Quadro 7** - Acompanhamento de carga parasitaria e evolução clínico-terapêutica por meio de PCR em tempo real dos pacientes do surto de doença de Chagas. 61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Resultados dos critérios diagnósticos considerados pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco, em comparação aos do sistema de *primers* TcSAT-IAM para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* 55
- Tabela 2** - Resultados do critério laboratorial - Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco, em comparação aos do sistema de *primers* TcSAT-IAM para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* 55
- Tabela 3** - Resultados do diagnóstico parasitológico em comparação aos do sistema de qPCR TcSAT-IAM para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* 57
- Tabela 4** - Resultados da sorologia IgM anti-*T. cruzi* em comparação aos do sistema de qPCR TcSAT-IAM para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* 58
- Tabela 5** - Tabela de dupla entrada relacionando os resultados do critério laboratorial, considerado pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco, em comparação aos do sistema de *Cruzi* para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* 59
- Tabela 6** - Resultados do critério laboratorial - Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco, em comparação aos do sistema *Cruzi* para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

® -	Registrado
µg -	Micrograma
µL -	Microlitro
Ct -	Ciclo <i>threshold</i> (Ciclo limiar)
CV	Coeficiente de variação
DC -	Doença de Chagas
DNA -	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
DTU	<i>Discrete typing units</i> (Unidades de tipagem discreta)
fg -	Fentograma
IAM -	Instituto Aggeu Magalhães
kDNA -	<i>kinetoplast DNA</i>
Min -	Minuto
ng -	Nanograma
NPT -	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
°C -	Graus Celcius
OMS -	Organização Mundial da Saúde
pb -	Pares de bases
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
pg -	Picograma
pmol -	Picomol
qPCR -	PCR quantitativa em Tempo Real
SAT-DNA -	DNA Satélite
SRDC -	Serviço de Referência em Doença de Chagas
Seg -	Segundo
T_m -	Temperatura de <i>melting</i> (Temperatura de fusão)
U -	Unidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 O <i>Trypanossoma cruzi</i>	17
2.1.1 Diversidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
2.1.2 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
2.2 Doença de Chagas: aspectos gerais	22
2.2.1 Transmissão da doença de Chagas	22
2.2.2 Fases clínicas da doença de Chagas	26
2.3 Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas	27
2.4 Diagnóstico molecular para a doença de Chagas	29
2.5 Surto da doença de Chagas em Pernambuco	32
3 JUSTIFICATIVA	34
4 PERGUNTA CONDUTORA	35
5 OBJETIVO GERAL	36
5.1 Objetivos Específicos	36
6 METODOLOGIA	37
6.1 Tipo de estudo	37
6.2 Escolha da região alvo e desenho de <i>primers</i>	37
6.3 Desenvolvimento da qPCR	37
6.4 Avaliação dos sistemas já publicados	39
6.5 Avaliação da reprodutibilidade	39
6.6 Amostragem	40
6.7 Coleta de amostras biológicas	40
6.8 Diagnóstico etiológico	41
6.9 Laudo de pesquisa	41
6.10 Acompanhamento clínico-terapêutico dos pacientes submetidos ao tratamento etiológico	42
6.11 Análise dos resultados	42
7 ASPÉCTOS ÉTICOS	44
8 RESULTADOS	45
8.1 Escolha da região alvo e desenho dos <i>primers</i>	45

8.2 Testes iniciais dos sistemas de <i>primers</i> e padronização das condições de reação da PCR em tempo real	47
8.3 Avaliação da reprodutibilidade	52
8.4 Teste em amostras	53
8.4.1 Caracterização amostral	53
8.4.2 Análises dos resultados do sistema TcSAT-IAM em comparação aos dos critérios estabelecidos pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco para diagnóstico dos casos	55
8.4.3 Avaliação do sistema TcSAT-IAM em relação aos testes parasitológicos diretos e sorologia IgM anti- <i>T. cruzi</i> para diagnóstico doença de Chagas, conforme II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas	57
8.4.4 Sistema <i>Cruzi</i> : análise de concordância com o sistema TcSAT-IAM e comparação com critérios diagnósticos estabelecidos pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco	58
8.4.5 Avaliação de outros espécimes clínicos	60
8.5 Acompanhamento clínico-terapêutico por PCR em tempo real em pacientes submetidos ao tratamento etiológico para doença de Chagas	60
9 DISCUSSÃO	63
10 CONCLUSÕES	70
11 CONSIDERAÇÕES	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICE A - LAUDO DE PESQUISA	79
APÊNDICE B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	80
APÊNDICE C - INSTRUÇÕES PARA COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS A SEREM DIRECIONADAS À PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	81

1 INTRODUÇÃO

Em virtude da magnitude da doença de Chagas, de sua elevada morbimortalidade que gera um grande impacto social e médico-trabalhista (BRASIL, 2019; DIAS et al., 2016; MALTA, 1996), além do tratamento etiológico nem sempre eficaz, justificam-se estudos que visem à melhoria da qualidade de vida dos portadores da enfermidade de Chagas. Assim, quanto mais rápido, sensível e específico for o diagnóstico, melhor será para conduta do médico.

O diagnóstico etiológico da DC pode ser realizado através da detecção do parasito no organismo, utilizando métodos parasitológicos, recomendados apenas na fase aguda. Já na fase crônica da doença os métodos imunológicos, que detectam anticorpos da classe IgG específicos ao *T. cruzi*, devem ser utilizados, sendo o diagnóstico nessa fase essencialmente sorológico (DIAS et al., 2016; GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009; LUQUETTI; RASSI, 2000).

Vários grupos de pesquisa têm avaliado a PCR, que apresenta uma alta sensibilidade e especificidade na amplificação de sequências tanto de DNA do cinetoplasto (kDNA), quanto DNA nuclear (SAT-DNA) de *T. cruzi* (D'ÁVILA et al., 2018; DUFFY et al., 2009; FERREIRA; MORAES, 2013; MOREIRA et al., 2013). Uma grande vantagem desta técnica é a obtenção dos resultados em tempo mínimo, ao contrário dos métodos parasitológicos indiretos, que apresentam seus resultados após semanas ou até meses, além da simplicidade de execução, melhor flexibilidade com os materiais em teste e a possibilidade de repetição destes, em caso de resultados duvidosos (LUQUETTI, RASSI, 2000; MARIN et al., 2002; YANG, ROTHMAN, 2004).

Este estudo buscou desenvolver novos sistemas de diagnóstico molecular, bem como avaliar os sistemas já publicados, visando sua utilização na detecção do DNA de *T. cruzi*. Após otimizações, o sistema aqui desenvolvido foi aplicado para diagnóstico em amostras de indivíduos suspeitos de infecção pelo *T. cruzi*, alcançando sua implementação no SRDC IAM/Fiocruz, para o diagnóstico da infecção aguda da doença de Chagas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A doença de Chagas (DC), considerada uma doença negligenciada, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e acomete milhões de pessoas em todo o mundo (DIAS et al., 2016).

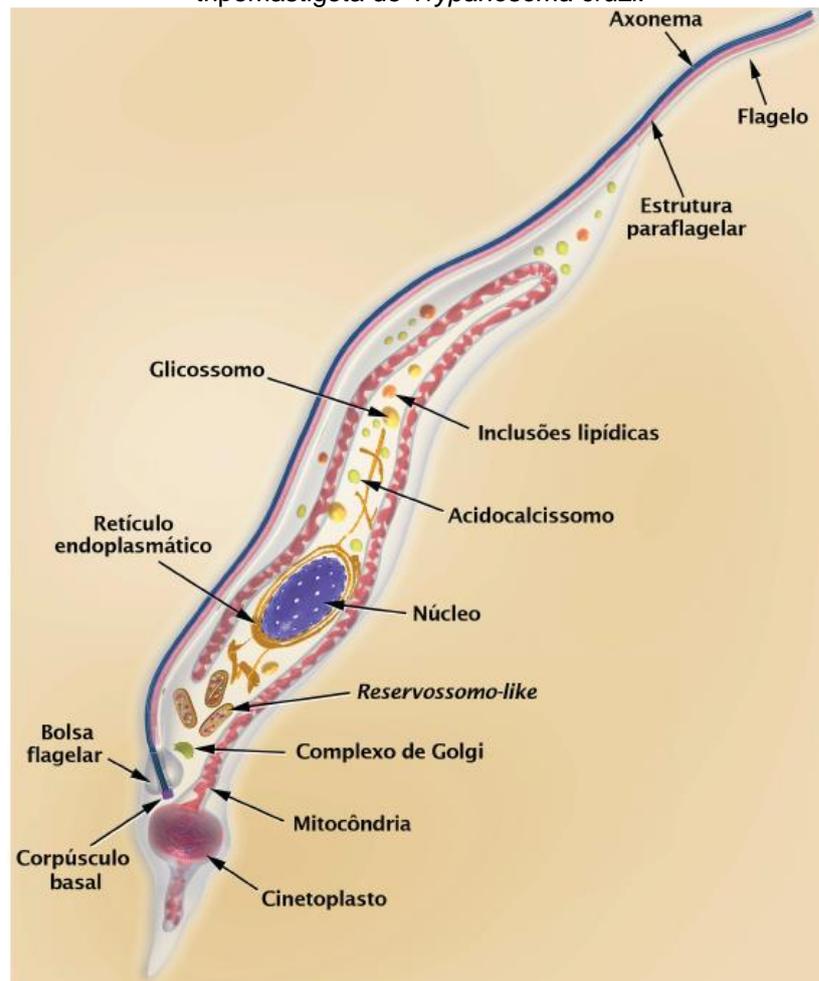
2.1 O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* (Figura 1), é um protozoário pertencente ao filo *Sarcomastigophora*, subfilo *Mastigophora*, da ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae* (RASSI et al., 2012).

Seu núcleo apresenta organização estrutural similar ao de células eucarióticas, tendo aproximadamente 2,5 μm de diâmetro, com nucléolo central e membrana externa apresentando continuidade à membrana do retículo endoplasmático. O parasito tem como características o flagelo, semelhante àqueles presentes em outros tripanossomatídeos, estando envolvido com o movimento celular e com a ligação do protozoário à superfície das células do hospedeiro vertebrado, bem como às membranas que revestem o intestino do hospedeiro invertebrado, e será projetado ao exterior por meio da bolsa flagelar, a qual o parasito utiliza para captar sua nutrição a partir do meio externo; o cinetoplasto, uma estrutura volumosa contendo DNA extranuclear; e um citoesqueleto, formado por micro-túbulos e localizado sob a membrana plasmática, participando de processos de diferenciação e motilidade do parasito (BRENER, 1997; FERREIRA; MORAES, 2013; RASSI et al., 2012; SOUZA, 1999; TEXEIRA et al., 2011).

O DNA do cinetoplasto (kDNA), que pode representar cerca de 30% do DNA total da célula, está localizado em uma região bem definida da única mitocôndria do parasito e é constituído por uma rede de maxicírculos e minicírculos, estes ligados de maneira concatenada (ligado extremidade a extremidade), sendo esta uma significativa distinção em relação a outros eucariotos (MACHADO, 2017; SOUZA, 1999; TEXEIRA et al., 2011).

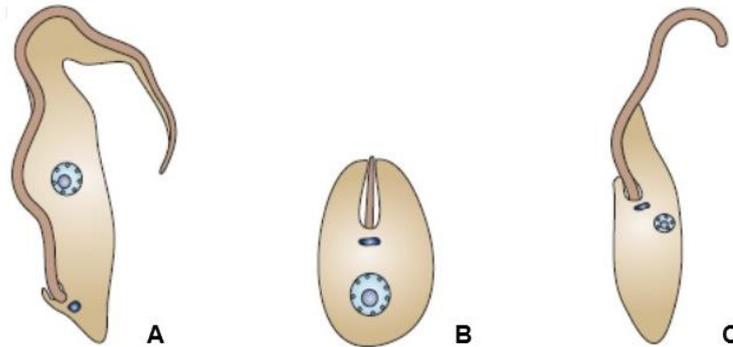
Figura 1 – Desenho esquemático demonstrando a organização estrutural intracelular da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Teixeira et al. (2011).

São três as formas evolutivas do *T. cruzi* (Figura 2), diferenciadas pela posição tanto do cinetoplasto, quanto do local de onde emerge o flagelo em relação ao núcleo celular, sendo elas as formas tripomastigota, na forma infectante do parasito onde o cinetoplasto encontra-se na parte posterior do flagelo e este emerge da bolsa flagelar; a forma epimastigota, ocorrendo na fase de multiplicação parasitária no intestino do inseto vetor e onde cinetoplasto e bolsa flagelar estão anteriores ao núcleo; e a forma amastigota, na qual acontece a replicação dos parasitos, por meio de divisão binária, no interior da célula hospedeira, e de flagelo imperceptível; além das diferentes formas de apresentação de seu núcleo, que nas formas epimastigota e amastigota possui formato arredondado e na forma tripomastigota possui um formato alongado (DIAS; COURA, 1997; FERREIRA; MORAES, 2013; TEIXEIRA et al, 2011).

Figura 2 - Desenhos esquemáticos das formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de Docampo et al. (2005).

Legenda: A – Forma Tripomastigota, B – Forma Amastigota, C – Forma Epimastigota.

2.1.1 Diversidade genética do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é genética e fenotipicamente diverso. É um organismo diplóide, com genoma aproximado de 110,7 Mb, tendo cerca de 50% dele composto de sequências repetitivas, possuindo ampla e bem definida diversidade genética intraespecífica (FREITAS et al., 2006).

Inicialmente, foi classificado em zimodemos I, II e III, por análise dos perfis eletroforéticos de isoenzimas. Posteriormente, foi classificado em três grupos distintos denominados de ribodemes I, II e III, por meio de análises de polimorfismos genéticos (CLARK; PUNG, 1994; MILES et al., 1977, 1978).

Em 2009, visando uniformizar a nomenclatura para classificação das cepas de *T. cruzi*, uma comissão de especialistas se reuniu e propôs a subdivisão da espécie em dois grupos principais, denominadas *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII), nos quais todas as outras classificações deveriam ser enquadradas (ANONYMOUS, 1999; ZINGALES et al., 2009). Em seguida, Brisse et al. (2000) analisaram marcadores genéticos por meio de RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) e MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) e propuseram a subdivisão do grupo TcII em cinco subgrupos, denominados TcIIa-TcIIe.

Posteriormente, um novo encontro de especialistas da área ocorreu e neste a nomenclatura das cepas de *T. cruzi* foi revista, determinando-se uma nova classificação, agora em seis *discrete typing units* (DTUs) distribuídas entre TcI – TcVI, além de Tcbat (esta restrita a quirópteros). As diferentes DTUs apresentam diferenças comportamentais nas populações parasitárias, como virulência e resistência a drogas, bem como interferem na prevalência de determinada forma

clínica e consequente gravidade das manifestações apresentadas, variando de acordo com a região geográfica (ZINGALES et al., 2009, 2018). Em humanos as infecções ocorrem predominantemente por meio das DTUs TcI, TcII, TcV e TcVI (MESSENGER; BERN, 2018).

No Brasil TcII é abundante nas regiões central e leste; TcIII está associado a infecções agudas na Amazônia brasileira; TcIV nesta mesma região, sendo associado a infecções orais; sendo, no entanto, a DTU TcII a de maior prevalência (ZINGALES, 2018). Quanto à região Nordeste do Brasil, ainda não existem dados oficiais ou informações disponíveis acerca das DTUs circulantes nesta área.

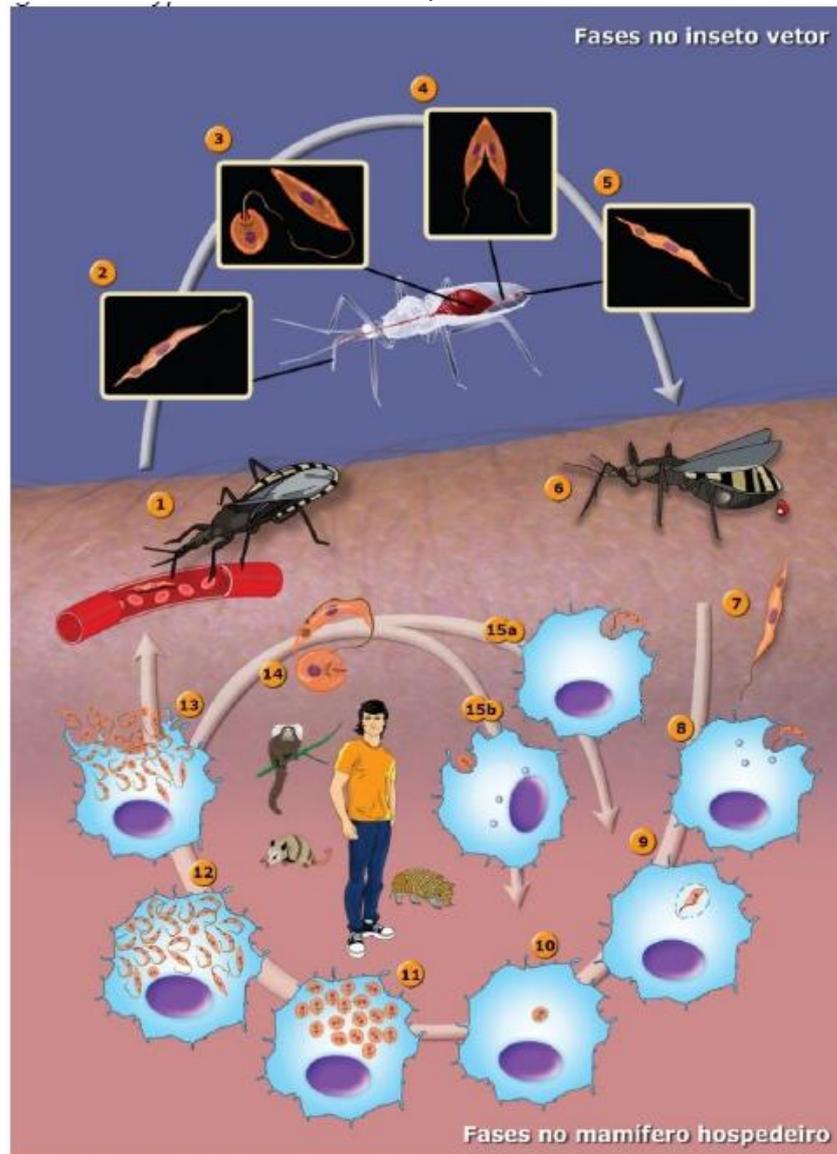
Registros de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *T. cruzi* em amostras mumificadas encontradas na América do Sul datam de até 9.000 anos, contribuindo para a identificação da diversidade genética, pois tais registros indicam infecções com as diferentes DTUs do parasito (ZINGALES, 2018).

2.1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O estudo do ciclo de vida do parasito se dá tanto no vetor quanto no hospedeiro vertebrado, podendo estes serem domésticos ou selvagens, envolvendo mais de 70 gêneros de hospedeiros mamíferos (FERREIRA; MORAES, 2013; ZINGALES, 2018).

Originalmente a DC chegou aos humanos por meio de vetores chamados triatomíneos (FERREIRA; MORAES, 2013). Esta via clássica de transmissão (Figura 3) é dependente de uma única subfamília de insetos, a Triatominae, capazes de transmitir todas as seis linhagens de *T. cruzi* descritas na literatura (JUSTI; GALVÃO, 2017; MOREIRA et al., 2017). Tais insetos já são conhecidos há alguns séculos, porém, sua adaptação ao ambiente doméstico é recente (COURA, 2007).

Figura 3 - Desenho esquemático do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* no inseto vetor e no mamífero hospedeiro.



Fonte: Teixeira et al. (2011).

Legenda: Descrição das etapas do ciclo de vida do *T. cruzi* no inseto vetor e no mamífero hospedeiro. No esquema, as figuras de 1-6 representam as etapas do ciclo heteroxênico do parasito no hospedeiro invertebrado: (1) contaminação do inseto vetor após picada em mamífero infectado e ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas (2); (3) migração destas para a porção anterior do estômago e diferenciação em epimastigotas; (4) estas alcançam o intestino e se multiplicam por divisão binária; (5) diferenciação em tripomastigotas metacíclicos. (6) Contaminação do hospedeiro vertebrado através do depósito de fezes e urina sobre a pele ou mucosa do mamífero. De 7-15b representam as etapas do ciclo heteroxênico do parasito no hospedeiro vertebrado: (7) forma tripomastigota; (8) invasão por meio de mucosas ou após lesões geradas na pele por onde o parasito pode penetrar, tendo acesso a circulação sanguínea e invadindo diferentes células; (9) etapa intracelular, com tripomastigotas localizados em vacúolos parasitóforos; (10) no interior destes os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas e ocorre a lise da membrana do vacúolo; (11) no citoplasma, as amastigotas se multiplicam por fissões binárias sucessivas; (12) diferenciação em tripomastigotas, passando por uma forma de transição; (13) célula hospedeira com excesso de parasitos; (14) lise da célula hospedeira; meio extracelular, tripomastigotas (15a) e amastigotas (15b) podem infectar novas células, deixando-os disponíveis para inoculação por outros triatomíneos.

2.2 Doença de Chagas: aspectos gerais

A DC é uma condição complexa e multifatorial, considerada potencialmente grave e fatal, sendo endêmica na América Latina, e que acarreta impacto econômico e de saúde pública, acometendo cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países latino-americanos (CARDOSO et al., 2018; MALAFAIA; RODRIGUES, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2018; VELASCO; MORILLO, 2018).

A DC é uma das dez doenças tropicais negligenciadas mais importantes, possuindo um tratamento com variação na eficiência dentre as diferentes fases da doença, podendo apresentar alta toxicidade; entretanto a infecção é passível de cura quando tratada precocemente. Quanto ao ônus econômico, estima-se que os custos mundiais com a doença circulem entre US\$7-19 bilhões anuais (GASCON, 2015; LEE et al., 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018; PINAZO; JUSTI; GALVÃO, 2017).

No Brasil a DC possui grande relevância, apesar do conhecimento epidemiológico acerca desta permanecer limitado, seja por debilidade nos programas de vigilância, seja pela demora em fechar o diagnóstico. Pesquisas recentes apontam que a prevalência é de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* em todo território nacional, estando entre as quatro principais causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias (BRASIL, 2019; DIAS et al., 2016; SANTOS et al., 2018).

2.2.1 Transmissão da doença de Chagas

Historicamente, a DC começou há milhões de anos de forma natural, como uma doença enzoótica que podia adaptar-se ao parasitismo em humanos (COURA, 1997; 2007). Classicamente transmitida aos humanos por meio de insetos hematófagos, a DC pode ser transmitida também por vias não vetoriais, podendo servir de porta de entrada para a infecção a transfusão de sangue e o transplante de órgãos sólidos ou de medula óssea infectados, a transmissão vertical, a contaminação oral e ainda a via acidental (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES

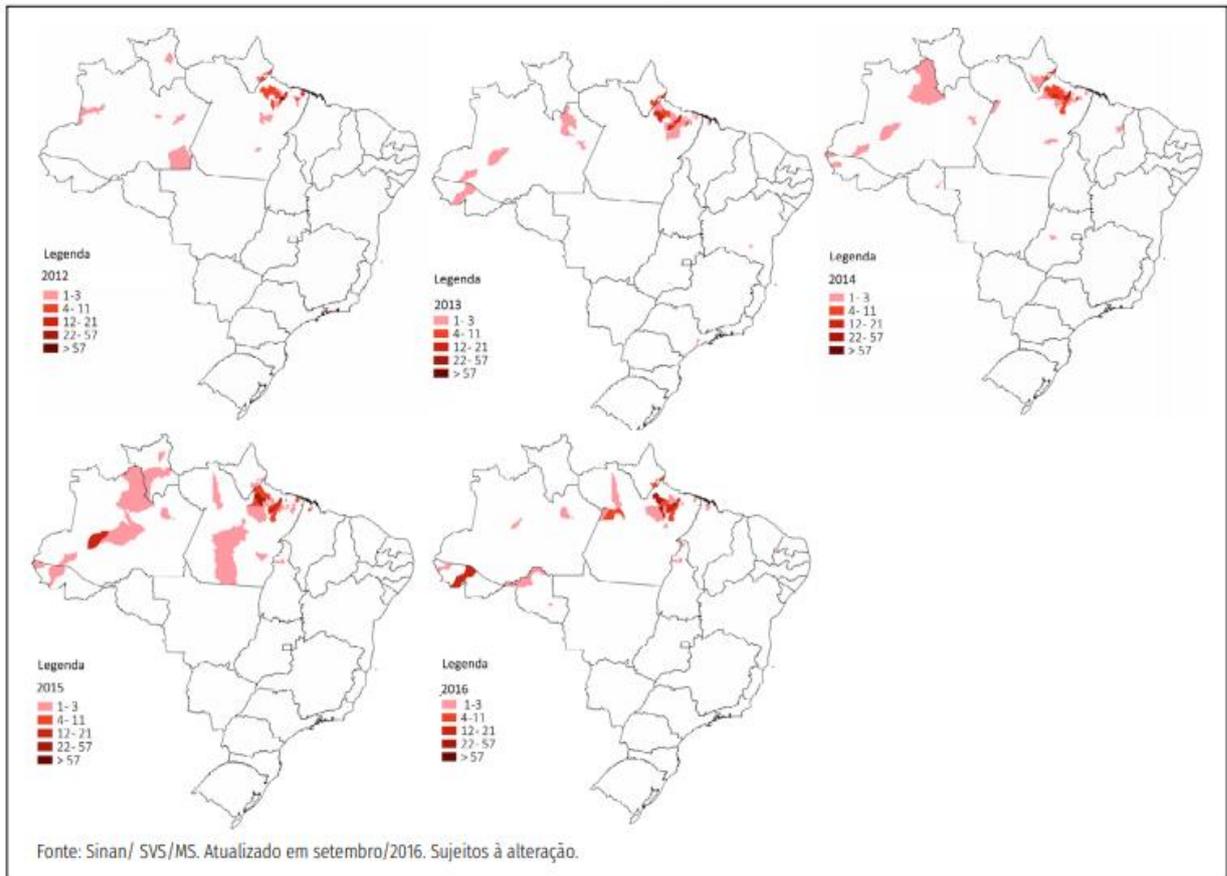
INITIATIVE, 2018; FARAL-TELLO et al., 2014; FERREIRA; MORAES, 2013; RASSI et al., 2012).

A DC tem recebido, nas últimas décadas, maior atenção quanto às medidas de melhoria nas habitações para o controle de seu principal vetor, o *Triatoma infestans*, estando o Brasil certificado desde 2006 que está livre da transmissão vetorial, bem como se tem intensificado a triagem sanguínea para doações (CARDOSO et al., 2018; RASSI et al., 2012; VELASCO; MORILLO, 2018). Apesar disso, ainda existem subnotificações de casos, bem como inexistência de programas de rastreamento de doenças em gestantes e recém-nascidos a nível nacional ou em áreas endêmicas, e a estimativa é que entre os anos de 2012 – 2016 a transmissão vetorial tenha sido responsável por 8,9% dos casos de DC aguda (BRASIL, 2019; SANTOS et al., 2018).

Diversos autores consideram a via transfusional como a segunda em ordem de importância (CARDOSO et al., 2018; SANTANA et al., 2018). Entretanto, outros trabalhos indicam que, nas áreas em que o inseto vetor é controlado, bem como devido ao alto controle transfusional, a infecção congênita tornou-se a mais importante via de transmissão epidemiológica em áreas endêmicas ou não, seguida da transmissão por via oral nas áreas rurais, que vem se tornando uma das mais relevantes onde, no Brasil, entre os anos de 2000 e 2011, 70% dos casos de infecção aguda notificados foram atribuídos à essa forma (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2018; FERREIRA; MATTOS et al., 2017; MORAES, 2013; SCHIJMAN, 2018; VOLTA et al., 2018); e dados recentes apontam que, atualmente, a principal via de transmissão é a oral (BRASIL, 2019). É fato que a migração humana tem auxiliado na disseminação da DC em países não endêmicos, pois indivíduos infectados podem continuar transmitindo o parasito, seja por transfusão sanguínea ou pela transmissão congênita (VELASCO; MORILLO, 2018).

Entre os anos de 2008 – 2017, casos agudos da DC foram registrados na maioria dos estados brasileiros e estima-se que, dentre as variadas prováveis formas de transmissão registradas no país, 72% foram por via oral, 9% via vetorial e em 18% dos casos a via de transmissão não foi identificada (BRASIL, 2019). Segundo o Boletim Epidemiológico de 2019 (BRASIL, 2019) entre os anos de 2012-2016 19.914 casos suspeitos de DC aguda foram registrados em todo o país (Figura 4), sendo 5,9% destes posteriormente confirmados.

Figura 4 - Distribuição dos casos de doença de Chagas aguda, segundo município de residência e ano de notificação, 2012 a 2016.



Fonte: Brasil (2019).

Um estudo recente relata um surto de DC aguda, ocorrido ao final de 2017 na região da Amazônia Brasileira, no qual 10 pacientes (todos parentes) apresentando a mesma sintomatologia obtiveram resultados positivos para a infecção por *T. cruzi*. Destes, 8 tiveram amostras submetidos ao xenodiagnóstico, cultura e PCR, bem como foram realizados testes na polpa de açaí recolhida da residência dos pacientes, com testes realizados paralelamente, além destas mesmas amostras serem submetidas a sequenciamento, que resultaram em concordância entre as tipagens de DTUs encontradas tanto nas amostras de sangue humano, quanto na polpa de açaí; todos os resultados levaram a conclusão que a contaminação se deu por via oral, através da ingestão da polpa de açaí (SANTANA et al., 2019).

A infecção congênita da DC ocorre pela transferência do parasito através da placenta ou pelo canal do parto, sendo a transplacentária a principal via de transmissão vertical, podendo levar a alterações ou prematuridade ao feto, em aproximadamente 5% das crianças nascidas de mães cronicamente infectadas em

áreas endêmicas, podendo ocorrer inclusive o agrupamento familiar de casos congênitos e, um fator que dificulta as notificações, é a ausência de sintomas em crianças congenitamente infectadas (COURA, 2007; SANTOS et al., 2018; VOLTA et al., 2018).

Em áreas não endêmicas, onde é crescente o número de novos casos devido à transmissão vertical, a investigação da DC em mulheres em idade reprodutiva é realizada por meio de testes sorológicos e/ou moleculares. Quando estas são diagnosticadas com a infecção, o tratamento é rapidamente realizado por meio da administração do benznidazol, visando a redução da parasitemia (ÁLVAREZ et al., 2017; CURA et al., 2017), sendo essencial o diagnóstico também de seus recém-nascidos e demais filhos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018). A infecção por *T. cruzi* diagnosticada em mulheres em idade reprodutiva demonstra a necessidade de monitoramento e avaliação, de forma efetiva e sistêmica, visando políticas públicas de saúde que auxiliem na prevenção e controle da infecção (SANTOS et al., 2018).

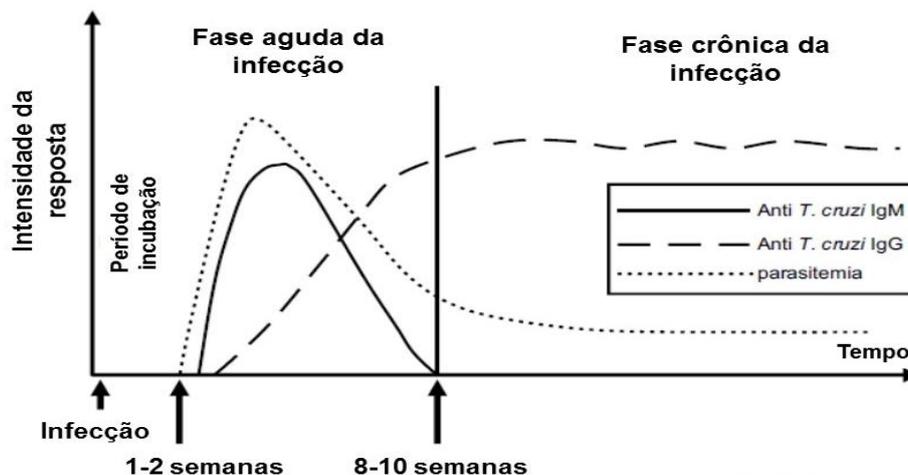
Estudos recentes apontam para uma possível via de transmissão: a via sexual. Almeida et al. (2019) demonstrou a possibilidade de infecção sexual por meio da aplicação de 100 µL de sêmen na cavidade peritoneal de camundongos machos, bem como esse mesmo volume foi aplicado na vagina de camundongos fêmeas, todos os animais eram negativos para DC previamente aos testes. Após 5 semanas, foram observados ninhos de amastigotas no coração e músculos esqueléticos, e aglomerados de parasitos também foram identificados no lúmen do ducto deferente e do tubo uterino. Um estudo pioneiro testou, em camundongos, a possibilidade de transmissão da DC a partir de machos infectados para fêmeas não infectadas. Apesar de baixo o risco para contaminação por acasalamento, ele se mostra presente.

Outro estudo avaliou camundongos de ambos os sexos infectados artificialmente, analisando a possibilidade de um macho infectado transmitir o parasito a uma fêmea não infectada, bem como a chance de a fêmea infectada transmitir ao macho não infectado; os resultados demonstraram que os animais sadios que acasalaram com animais infectados adquiriram a infecção. Estes dados demonstram que essa é uma importante via de transmissão a ser investigada, podendo contribuir para a manutenção do ciclo parasitário (MARTIN et al., 2015; RIOS et al., 2018).

2.2.2 Fases Clínicas da doença de Chagas

A DC apresenta as fases clínicas aguda e crônica (Figura 5). Nesta primeira, parte dos indivíduos pode não apresentar sintomas. Quando estes estão presentes, iniciam cerca de 8-10 dias após a transmissão vetorial ou 20-40 dias após infecção por via transfusional, incluindo febre prolongada, nódulos linfáticos, aumento de fígado e baço, dentre outros sintomas; menos frequentemente, têm-se os sinais de porta de entrada: chagoma e sinal de Romaña, quando por via vetorial. Não havendo um tratamento ou este sendo inespecífico ou ineficaz, aproximadamente 2 a 3 meses após a infecção inicial, haverá a passagem para um estado de latência chamado de forma crônica indeterminada, podendo este se estender por toda a vida ou, após 10-30 anos, levar a comprometimentos de órgãos (PÍRON et al., 2007; RASSI et al., 2012).

Figura 5 – Evolução parasitológica e sorológica nas fases aguda e crônica da doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de Rassi et al. (2012, tradução nossa).

Na sua forma crônica a doença é caracterizada pela baixa parasitemia e pela elevação dos níveis de anticorpos IgG (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003). Cerca de 60% - 70% dos pacientes permanecerão com a forma clínica indeterminada por toda a vida, não demonstrando sintomas clínicos, mas apresentando sorologia positiva para anticorpos anti- *T. cruzi*. Cerca de 30% - 40% dos indivíduos, no entanto, passarão a um estágio clínico sintomático. A forma cardíaca é a apresentação mais grave da fase crônica, sendo a morte súbita

cardíaca responsável por quase dois terços de todas as mortes na cardiopatia de chagas. A forma digestiva leva a alterações nas funções de movimento, secreção e absorção do esôfago e do trato gastrointestinal, sendo o esôfago e o cólon as partes comprometidas mais frequentemente (DUFFY et al., 2009; RASSI et al., 2012; STEVERDING, 2014).

Para que exista o controle da DC fazem-se necessárias ações desde a interrupção dos mecanismos transmissores, com educação sanitária para populações expostas, até o tratamento de casos agudos e crônicos (COURA; DIAS, 2009). É recomendada também a testagem aos familiares ou indivíduos assintomáticos que estiveram sob a mesma exposição dos casos confirmados decorrentes de surto (BRASIL, 2009).

Atualmente, para o tratamento da DC, duas drogas são utilizadas: o benznidazol (produzido no Brasil pelo LAFEPE, como Benznidazol LAFEPE®, e na Argentina pela Maprimed/ELEA, como Abarax®) e o nifurtimox (produzido na Alemanha, como Lampit™, Bayer HealthCare AG), no entanto a sua eficácia é maior na fase aguda da doença em relação a fase crônica, bem como ambas medicações possuem alta toxicidade (MORILLA; ROMERO, 2015), além da possibilidade de algumas cepas de *T. cruzi* desenvolverem resistência contra tais medicamentos, com um percentual de apenas 50% dos pacientes tratados respondendo às drogas (HABERLAND et al., 2013).

2.3 Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas

Após a descoberta da DC as técnicas de reação de fixação do complemento e de xenodiagnóstico foram consideradas como grandes avanços e passaram a ser aplicadas à pesquisa dessa parasitose, permitindo o diagnóstico sorológico e o isolamento do *T. cruzi*, respectivamente (COURA, 1997). Atualmente, o diagnóstico da infecção por *T. cruzi* se dá por meio de diferentes técnicas laboratoriais, devendo seguir critérios definidos dependentes da fase da doença (DIAS et al., 2016).

Durante a fase aguda da DC, devido à alta parasitemia na circulação periférica, o diagnóstico pode ser realizado pelo exame direto do sangue, por meio da detecção direta do parasito (BONNEY, 2014; D'ÁVILA et al., 2018; DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2018). Tidas como “padrão ouro” para diagnóstico nesta fase da doença, as técnicas parasitológicas diretas são a pesquisa

a fresco de tripanossomatídeos, utilizando uma gota de sangue entre lâmina e lamínula, e posterior visualização ao microscópio; os métodos de concentração (strout, microhematócrito ou creme leucocitário); e a técnica de lâmina corada de gota espessa, utilizando-se aproximadamente 4 gotas de sangue formando um retângulo, devendo ser localizadas na parte central da lâmina, ou esfregaço, em que uma gota de sangue, distribuída no centro de uma lâmina, é espalhada um movimento rápido com apoio de outra lâmina, formando uma delgada camada de sangue. Deve-se observar que, ao se obter resultados negativos na primeira coleta, novas coletas devem ser realizadas até a confirmação do caso ou até que os sintomas que levaram à suspeita da infecção aguda tenham desaparecido, ou até que haja confirmação de outra hipótese diagnóstica (BRASIL, 2013; DIAS et al., 2016; RASSI et al. 2012).

A técnica de microhematócrito também pode ser utilizada para identificação parasitária na infecção por via congênita, sendo apontada como um método sensível, necessitando de uma quantidade pequena de sangue para sua realização (RASSI et al., 2012). As técnicas diretas, no entanto, apresentam variações de sensibilidade (50 – 95%), devido a inúmeros fatores como no caso da necessidade de um microscopista qualificado (FERREIRA; MORAES, 2013).

Em sua forma crônica e assintomática, o diagnóstico acontece por detecção sorológica, utilizando ensaios imunoenzimáticos, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta ou imunocromatografia para testar a presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* (BONNEY, 2014; DUFFY et al., 2009). As técnicas indiretas são importantes principalmente na fase crônica da infecção, quando o encontro do parasito no exame direto é quase impossível (COURA, 1997). No entanto, a baixa sensibilidade de tais técnicas traz limitações à sua aplicação ao diagnóstico e controle pós-tratamento (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003).

A imunofluorescência indireta, por exemplo, apresenta sensibilidade em torno de 99%, no entanto várias desvantagens, como a produção limitada de amostras, os problemas de padronização e controle de qualidade e o baixo grau de automação, que limita a execução desta à profissionais altamente especializados, implicam na busca pela padronização de outras metodologias diagnósticas (HABERLAND et al., 2013). Um problema, ocasionado pela própria dinâmica da doença, em relação aos kits de diagnóstico sorológico, é quanto a inviabilidade destes em fornecer

resultados fidedignos para os casos de transmissão congênita, pois os recém-nascidos (filhos de mães portadoras da doença de Chagas) apresentam anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG provindos da mãe, o que favorece um diagnóstico falso-positivo (REYES et al., 1990).

As metodologias diagnósticas disponíveis, tanto por técnicas parasitológicas quanto sorológicas, possuem limitações especialmente na fase crônica dessa parasitose, seja referente à sensibilidade, pelos títulos de anticorpos específicos ao *T. cruzi* que geralmente não diminuem mesmo após longo tratamento, seja à especificidade, como pelo risco de contaminações cruzadas com outros tripanossomatídeos (D'ÁVILA et al., 2018; PARRADO et al., 2018), podendo haver resultados falso-positivos por reações inespecíficas, quando ocorre contaminação cruzada entre amostras, ou mesmo quando esta é inadequada (SANTANA et al., 2018).

2.4 Diagnóstico molecular para a doença de Chagas

Devido às dificuldades encontradas para o diagnóstico da DC diante das técnicas clássicas, bem como para o acompanhamento dos casos, novas metodologias têm sido buscadas. Técnicas de diagnóstico baseadas na detecção de DNA, como a PCR e uma variante desta, conhecida como PCR quantitativa em tempo real (qPCR), surgem como oportunidades de monitoramento dos níveis parasitários na corrente sanguínea do indivíduo infectado (MOREIRA et al., 2017; PARRADO et al., 2018). Estudos têm demonstrado vantagens da PCR em tempo real para a triagem, bem como para a quantificação do DNA de *T. cruzi* (DUFFY et al., 2009).

A PCR convencional, embora não permita possibilidade de quantificação do DNA, tem sido testada para a identificação do SAT-DNA de *T. cruzi* no sangue periférico de indivíduos cronicamente infectados, apresentando alta sensibilidade (identificando 98,9% dos pacientes) em relação aos resultados obtidos por cultura de células e qPCR (VOLPATO et al., 2017). No entanto, como aponta D'avilla et al. (2018) a PCR convencional não permite o monitoramento de carga parasitária, o que fortalece a importância da técnica quantitativa. Outro trabalho, este desenvolvido com a qPCR, com amostras de sangue coletadas a partir de cenários clínicos

distintos, demonstrou uma ampla faixa de medições nos casos com altas cargas parasitárias, tanto quanto nos casos com baixas parasitemias (DUFFY et al., 2009).

Seguindo, outras pesquisas visando combinar e validar procedimentos padrões para detecção e quantificação de DNA parasitário em amostras de sangue foram realizados, no qual os de melhor desempenho (também para o alvo do SAT-DNA) alcançaram aproximadamente 70% de positividade em pacientes crônicos não tratados (PARRADO et al., 2018).

Diante das dificuldades encontradas para o diagnóstico da DC em sua fase crônica, faz-se necessário a busca por um método mais sensível e específico, uma ferramenta que possa vir a ser utilizada para avaliação e acompanhamento dos pacientes; e estudos vêm mostrando que a qPCR possui tal potencial, afirmando que a mesma possui alta sensibilidade para a detecção do DNA de *T. cruzi* em relação à técnicas clássicas, mesmo em baixas concentrações de DNA parasitário na amostra (D'ÁVILA et al., 2018; DUFFY et al., 2009; FERREIRA; MORAES, 2013; MOREIRA et al., 2013).

Kirchhoff et al. (1996) compararam a habilidade da PCR com a da microscopia em detectar parasitos no sangue de camundongos infectados com *T. cruzi*, demonstrando que, durante a fase crônica da infecção, a sensibilidade da técnica de PCR se mostrou superior à da microscopia na identificação de DNA parasitário, em camundongos, se tornando positiva 3,9 dias antes da microscopia. Fatores como o volume de sangue utilizado, que na microscopia foi cerca de 50 vezes menor, além da necessidade de processamento imediato para detecção microscópica, enquanto para verificação por PCR a amostra pode ser processada posteriormente, também são citados como pontos importantes em favor da técnica molecular.

Estudos preliminares para detectar DNA nuclear de *T. cruzi* através de PCR não demonstraram diferenças significativas entre o uso de amostras de soro e sangue total, indicando, assim, a possibilidade do uso de soro como amostra para o diagnóstico molecular da doença de Chagas (MELO et al., 2015; RUSSOMANDO et al., 1992). Russomando et al. (1992) utilizaram amostras de soro de pacientes positivos para DC, tanto por métodos sorológicos, quanto por isolamento de parasitos. Todas as amostras submetidas a PCR obtiveram resultados positivos para a técnica, indicando que ao menos uma pequena quantidade de DNA parasitário estava presente no soro dos pacientes, ao que os autores concluem que a

circulação ativa dos parasitos resulte num possível derramamento de seu DNA na corrente sanguínea, demonstrando que, o soro também pode vir a ser utilizado para a investigação da infecção.

Duffy et al. (2009) afirmam que o DNA nuclear de *T. cruzi* é altamente conservado, o que indica sua utilização para amplificação com qPCR. Moreira et al. (2013) também utilizaram sistema de *primers* direcionados ao SAT-DNA de *T. cruzi*, indicando que a qPCR é uma metodologia propícia para quantificação de carga parasitária em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica, podendo ser utilizada para monitoramento de eficácia terapêutica.

Virreira et al. (2003) utilizou amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos filhos de mães infectadas e não infectadas, analisando-as por exame microscópico direto e por PCR. A técnica molecular alcançou sensibilidade de 1fg, e, com relação à especificidade, os *primers* amplificaram toda a linhagem de *T. cruzi* sem amplificar de outras espécies, demonstrando ser uma metodologia eficiente na detecção parasitária em recém-nascidos com infecção congênita, além de ter alcançado concordância com os resultados do diagnóstico padrão.

O diagnóstico precoce da transmissão vertical do *T. cruzi* neste grupo é importante e deve ser uma prioridade, pois garante um tratamento tripanocida efetivo, geralmente resultando na cura da infecção (PICADO et al., 2018; VOLTA et al., 2018). No entanto, acaba sendo dificultado por muitas restrições biológicas e operacionais. A PCR surge como uma metodologia diagnóstica altamente promissora, especialmente para os casos em que a carga parasitária é inferior ao limiar de detecção microscópica (MESSENGER; BERN, 2018). Porém, o uso de ferramentas moleculares para o diagnóstico de lactentes infectados congenitamente pelo *T. cruzi* ainda é restrito (PICADO et al., 2018). Volta et al. (2018) apontam, inclusive, que é de grande importância o seguimento de 1 ano para teste de títulos sorológicos ou realização de testes adicionais para detecção parasitária em crianças nascidas de mães infectadas por *T. cruzi*, sendo a qPCR útil para tal acompanhamento.

O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Chagas (BRASIL, 2019) informa que não existem evidências para a realização de metodologias sorológicas para acompanhamento pós-tratamento, mas aponta que existem estudos sugerindo o uso da PCR para observar a resposta clínica, ressaltando que a técnica ainda é restrita a atividades de pesquisa.

A técnica de qPCR foi utilizada para acompanhamento terapêutico de uma criança infectada congenitamente onde, após tratamento, o diagnóstico resultou em ausência de carga parasitária nas amostras testadas; resultado este satisfatório em relação à técnica padrão de diagnóstico (técnica sorológica) que obteve ausência de reação (VOLTA et al., 2018).

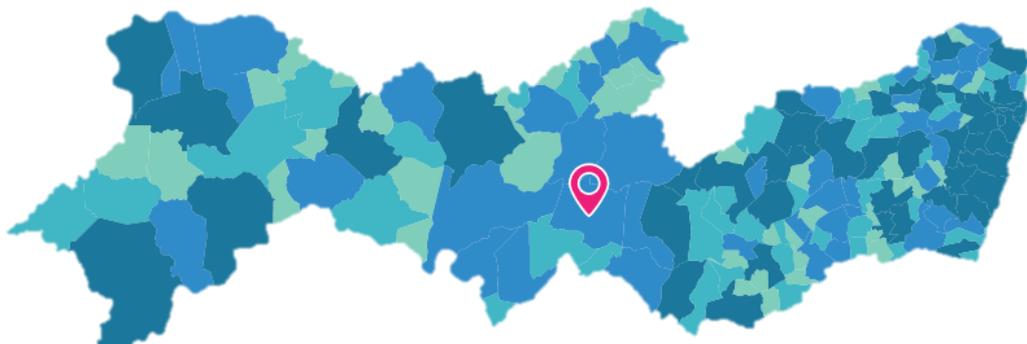
Embora recomendada pelo Ministério da Saúde, não existe uma PCR, quer seja qualitativa, quer seja quantitativa, padronizada e validada nacionalmente e, portanto, ainda não está em ampla utilização pelos laboratórios de saúde, mas apenas em laboratórios de pesquisa. Além disso, uma PCR que possa quantificar o DNA de *T. cruzi* e ser utilizada para acompanhar a evolução pós-tratamento, mostre-se de grande importância, sendo a técnica recomendada inclusive como metodologia alternativa para o controle de cura após o tratamento antiparasitário (DIAS et al., 2016; MOREIRA et al., 2013; RASSI et al., 2012; VELOSO et al., 2008).

Haberland et al. (2013) apontam que, com a contínua busca por melhorias na técnica, a PCR pode vir a ser empregada no diagnóstico ou confirmação da infecção pelo *T. cruzi*, podendo chegar à ferramenta de primeira linha no diagnóstico desta enfermidade.

2.5 Surto de doença de Chagas em Pernambuco

No mês de abril de 2019, durante o feriado da Páscoa, 77 pessoas participaram de um evento religioso sediado em uma escola do município de Ibimirim, cidade situada na mesorregião do sertão de Pernambuco (Figura 6). Estes indivíduos, de ambos os sexos e de idades variadas, foram expostos a um surto de doença de Chagas, o primeiro do estado pernambucano.

Figura 6- Mapa do Estado de Pernambuco com destaque para o município de Ibimirim.



Fonte: IBGE (2017).

Posteriormente ao evento, alguns participantes apresentaram sintomatologias como: cefaleia, febre, dor abdominal, náuseas, eritema, mialgias, dores articulares, calafrios, dispneia, astenia, dentre outros sintomas; além de casos de arritmias, hepatomegalia e esplenomegalia. No entanto, parte das pessoas que esteve presente no evento não manifestou quaisquer sintomas.

Surtos orais podem variar em relação ao número de envolvidos, bem como no que diz respeito à sintomatologia clínica apresentada, variando tanto em relação às outras formas de infecção, quanto à gravidade dentre os indivíduos do mesmo surto (ZINGALES, 2018).

Todos 77 os indivíduos foram atendidos por equipes médicas, e passaram por coleta de amostras biológicas para o diagnóstico da infecção de Chagas. A infecção foi confirmada em parte dos indivíduos.

O Serviço de Referência em Doença de Chagas (SRDC) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), da Fiocruz Pernambuco realizou a testagem sorológica para todos os indivíduos, bem como a realização de testes moleculares por meio da técnica de qPCR, fazendo uso de um sistema de *primers* desenvolvido pela própria equipe do SRDC e outro sistema predito na literatura, ampliando as ferramentas diagnósticas disponíveis, com intuito de fornecer maior segurança e confiabilidade aos resultados.

Seguindo as investigações sobre o caso, não foi identificado nenhum sinal de “porta de entrada” em nenhum dos pacientes, que indicaria a possibilidade de infecção por via vetorial. Concluiu-se que a infecção se deu possivelmente por via oral, por meio de ingestão de alimentos contaminados, pois todas as refeições foram realizadas de maneira comum por todos os participantes do evento, de tal forma que todos os alimentos consumidos no período foram preparados e consumidos no local pelos próprios participantes. Dos 77 indivíduos expostos ao surto, 39 foram considerados caso, ou seja, portadores da infecção pelo *T. cruzi* (Secretaria Estadual de Saúde - dados não publicados). Todos foram submetidos ao tratamento etiológico recomendado, conforme preconiza o II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (DIAS et al., 2016), segundo critério médico.

3 JUSTIFICATIVA

Considerando que várias ocorrências recentes de surtos por transmissão oral têm sido documentadas, levantando a preocupação sobre o ressurgimento da doença no Brasil e que, atualmente, na rotina laboratorial não se dispõe de um método molecular para detecção de *T. cruzi* que possa vir a ser utilizado para o diagnóstico da fase crônica da doença, em caso de suspeita de infecção congênita, bem como pela necessidade de uma ferramenta otimizada para o acompanhamento do tratamento etiológico, foi proposto o desenvolvimento de sistemas de *primers* para PCR em tempo real, além da avaliação de sistemas já descritos na literatura, visando a identificação do DNA de *T. cruzi*.

Durante a fase aguda da infecção, fatores como o curto período de sintomas específicos, podem levar a um atraso na investigação por não se chegar à suspeita, o que dificulta o diagnóstico. Embora específicos, os testes parasitológicos possuem baixa sensibilidade, pois se faz necessário laboratoristas bem treinados, sendo este outro ponto importante e que pode prejudicar o diagnóstico. No caso dos testes sorológicos para a fase aguda, são raros os kits de sorologia certificados pela Anvisa disponíveis no mercado. O RIFI para detecção de IgM pode apresentar uma importante parcela de resultados falso-positivos, prejudicando também a confiabilidade no diagnóstico. Nos casos de recém-nascidos, filhos de mães portadoras de DC o diagnóstico também é dificultado, tendo em vista que a sorologia para detecção de IgG anti-*T. cruzi*, realizada para o acompanhamento/diagnóstico do bebê, pode detectar anticorpos circulantes ainda provindos da mãe, mesmo alguns meses após o nascimento.

Ter uma ferramenta diagnóstica que oferece sensibilidade e especificidade elevadas se mostra de grande importância. O II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015, que define os critérios para o diagnóstico da DC recomenda a técnica molecular para auxílio no diagnóstico de casos inconclusivos e discordantes, bem como para o acompanhamento de falha terapêutica dos indivíduos submetidos ao tratamento etiológico. Assim, estudos visando a otimização e validação de sistemas para a qPCR são necessários para o alcance de uma metodologia confiável que possa ser disponibilizada à sociedade.

4 PERGUNTA CONDUTORA

A técnica de PCR em tempo real se mostra eficaz para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostras biológicas de indivíduos portadores da infecção aguda da doença de Chagas?

5 OBJETIVO GERAL

Aplicar o diagnóstico molecular para detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*, em amostras biológicas.

5.1 Objetivos específicos

- a) Desenvolver, avaliar e otimizar sistemas de *primers* para o diagnóstico da doença de Chagas por PCR em tempo real;
- b) Determinar o(s) melhor(es) sistema(s) de *primers* para detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*;
- c) Aplicar o(s) sistema(s) de *primers* em amostras de indivíduos envolvidos no surto de doença de Chagas ocorrido no município de Ibimirim-PE;
- d) Aplicar o sistema de *primers* para o monitoramento de carga parasitária e/ou falha terapêutica dos indivíduos envolvidos no surto de doença de Chagas, tratados após diagnóstico de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

6 METODOLOGIA

Nesta seção serão abordados os aspectos metodológicos utilizados para a realização da pesquisa.

6.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo analítico de validação de método diagnóstico, no qual buscam-se determinar os parâmetros de sensibilidade e especificidade em uma amostra (SACKETT; HAYNES, 2002).

6.2 Escolha da região alvo e desenho dos *primers*

De acordo com Kumar et al. (2016), com auxílio do *software* Mega (versão 7.0), foi efetuado o alinhamento múltiplo das sequências do kDNA e do SAT-DNA de *T. cruzi*, disponíveis no banco de dados GenBank (sequências brutas disponíveis publicamente em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) afim de identificar potenciais regiões alvo que não apresentem semelhanças com outras espécies de tripanossomatídeos. Como controle, realizou-se também o alinhamento entre sequências de *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

Com o auxílio do *software* Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) foram desenhados *primers* para detecção de *T. cruzi*. Após análise e escolha das regiões, foram realizadas análises *in silico* visando avaliações de especificidade, análises da conservação, cobertura e identidade das sequências, por meio do *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide* (BLASTn).

6.3 Desenvolvimento da qPCR

Por meio da combinação dos *primers*, foram criados sistemas de detecção tanto para o kDNA, quanto para o SAT-DNA de *T. cruzi*. Para a escolha do melhor sistema, foi efetuado um experimento preliminar de acordo com Paiva-Cavalcanti et al. (2009).

Foi utilizado como padrão o DNA genômico de *T. cruzi* (Cepa Y), contendo

100 pg, 10 pg e 1 pg e controle negativo (amostra sem DNA). A extração do DNA padrão para a quantificação de DNA parasitário, a partir de amostras de *pellet* de *T. cruzi*, foi realizada utilizando kit comercial, seguindo recomendações do fabricante, as quais compreendem basicamente 03 etapas (lise de células, lavagem da mini coluna e eluição do DNA). O DNA foi posteriormente dosado e, após análise, submetido a diluições seriadas (fator 10) nas concentrações de 0,5 ng/ μ L - 0,5 fg/ μ L. Essas soluções contendo o DNA parasitário foram utilizadas nas reações de PCR em tempo real, como referência. Os sistemas desenvolvidos nesse estudo e os preditos na literatura foram testados, inicialmente, na tentativa de detecção do DNA de *T. cruzi*.

Após análises dos resultados do experimento preliminar, os sistemas escolhidos à seguirem na pesquisa foram testados quanto ao seu limite de detecção, o qual foi definido pela amplificação da mais alta diluição do DNA alvo quando comparado à formação de dímeros de *primers* em amostras sem DNA (TOO, 2003), utilizando DNA genômico de *T. cruzi* (Cepa Y) nas quantidades de 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg, bem como controle negativo da reação de qPCR, composta pelo Master Mix e *primers*, sem adição de DNA.

Para avaliação da especificidade (σ), a qual foi definida pela equação $\sigma = (1 + \varepsilon)^{\Delta C_t}$, sendo analisada de forma logarítmica (Log_{10}), foi utilizado DNA genômico de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*, nas quantidades de 1 ng, 100 pg e 100 fg. A Eficiência da reação foi determinada de acordo com Too (2003), por meio da fórmula: $\varepsilon = (10^{1/\text{slope}}) - 1$.

Na etapa de teste em amostras, como controle de qualidade das amostras usadas nas reações moleculares foi utilizada à amplificação do gene humano G3PD, conforme protocolo descrito por Gonçalves et al. (2012). O DNA genômico de *T. cruzi* (Cepa Y) foi utilizado como curva padrão, nas quantidades de 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg, bem como controle negativo da reação de qPCR, composta pelo Master Mix e *primers*, sem adição de DNA. Ainda, duas amostras de controle negativo, coletadas a partir de indivíduos negativos para infecção pelo *T. cruzi* (seguindo as recomendações preconizadas como descrito no item 6.4) foram utilizadas para um maior controle dos resultados. A extração de DNA das amostras biológicas também foi efetuada por meio de kit comercial (QIAamp DNA Mini Kit – QIAGEN, Holanda), seguindo as instruções dos fabricantes.

Para todas as etapas, as amostras foram testadas em duplicata. Todos os *primers* estavam na concentração de 5 pmol/ μ L e, para cada sistema de *primers*, foi preparado um Master Mix num volume de 48 μ L por amostra/poço, sendo as reações compostas por 21 μ L de água tipo 1, 1 μ L do *primer forward* e 1 μ L do *primer reverse*, 25 μ L de SYBR[®] Green Master Mix e, após distribuição na placa de PCR, 2 μ L de DNA padrão (nas concentrações indicadas no tópico 6.5) foram adicionados a seu respectivo poço, totalizando um volume final de 50 μ L por amostra, exceto para a amostra de controle negativo da reação de qPCR que não conta com a adição dos 2 μ L de DNA padrão, totalizando 48 μ L. Os experimentos foram efetuados com o aparelho *QuantStudio 5 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as condições de ciclagem padrão do aparelho: aquecimento inicial (50° / 2 Min), desnaturação inicial (95°C / 10 Min), 40 ciclos de desnaturação (95°C / 15 Seg), anelamento e extensão (60°C / 1 Min) e dissociação (95° / 1 Seg). A análise, interpretação e registro dos resultados foram efetuados com o auxílio do *QuantStudio Design and Analysis Software*.

6.4 Avaliação dos sistemas já publicados

Os sistemas TCZ (MOSER et al., 1989) e Cruzei (PÍRON et al., 2007) (Quadro 1), foram avaliados e comparados quanto a limite de detecção, eficiência e especificidade com o sistema desenvolvido neste estudo.

Quadro 1 - Sistemas de *primers* preditos na literatura testados para detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*.

Alvo	Sistema	Primers	Sequência dos <i>primers</i>	Bases	Tamanho do produto	% CG	T _m
SAT-DNA	TCZ	TCZ1	F 5'CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT3'	24	188	67	64,2°
		TCZ2	R5'CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG3'	24		58	60,8°
	Cruzei	Cruzei1	F 5'ASTCGGCTGATCGTTTTCGA3'	20	166	50	51,8°
		Cruzei2	R 5'AATTCCTCCAAGCAGCGGATA3'	21		48	52,4°

Fonte: A autora, 2019.

Legenda: SAT-DNA: DNA satélite. F: *forward*. R: *reverse*. %CG: Percentual de bases citosina (C) e guanina (G). T_m: Temperatura de *melting*.

6.5 Avaliação da reprodutibilidade

Para avaliação da reprodutibilidade dos sistemas de qPCR, análises intra e inter-ensaio foram efetuadas. Para tanto, as amostras foram processadas em duplicata ou triplicata, sendo o mesmo experimento repetido três vezes. O ponto em que a curva de amplificação ultrapassa o limiar (ciclo limiar - valores C_t (Ciclo *threshold*) foi utilizado para calcular o coeficiente de variação (CV) entre as repetições. Tanto para o cálculo do CV intra-ensaio, quanto do CV inter-ensaio as concentrações da curva de amplificação utilizadas foram 0,5 fg/ μ L, 5 fg/ μ L, 50 fg/ μ L e 0,5 pg/ μ L. No caso do CV intra-ensaio, o experimento foi realizado com amostras em triplicata e os valores de C_t de cada replicata nas dadas concentrações foram utilizados. Para calcular o CV inter-ensaio a média dos valores de C_t obtidos entre as replicatas foi utilizada, sendo comparadas em três experimentos independentes. O CV é a razão do desvio-padrão pela média dos C_t s das amostras testadas, sendo convertido em percentual. Estes cálculos foram realizados com o auxílio de calculadora estatística *online* (<https://www.miniwebtool.com/coefficient-of-variation-calculator/>).

6.6 Amostragem

Amostras de sangue total, de líquido cefalorraquidiano (LCR) e de sêmen, oriundas do Serviço de Referência em Doença de Chagas, Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (SRDC - IAM/Fiocruz-PE), provenientes de 77 pacientes envolvidos no surto de doença de Chagas em Pernambuco, foram utilizadas para compor a amostragem deste estudo.

6.7 Coleta de amostras biológicas

Na etapa de diagnóstico, amostras de sangue total (em tubos contendo EDTA-5 mL), para a realização de PCR e dos testes parasitológicos diretos; LCR e sêmen, para a realização de PCR; e amostras coletadas em tubos secos (5 mL), para obtenção de soro, foram recebidas do Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Milton Bezerra Sobral, da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco (LACEN-PE).

Na etapa de acompanhamento pós-tratamento etiológico, por solicitação dos médicos do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, da Universidade de Pernambuco

(HUOC/UPE) amostras de sangue total e soro foram coletadas pela equipe do SRDC – IAM/FIOCRUZ-PE, após antisepsia com algodão embebido em álcool etílico 70%.

Todas as amostras (recebidas e coletadas) direcionadas a PCR foram armazenadas a -20°C para posterior extração de DNA, ou imediatamente utilizadas. Todo processamento foi realizado no SRDC - IAM/Fiocruz-PE.

6.8 Diagnóstico etiológico

Para o diagnóstico parasitológico foram utilizadas técnicas de pesquisa direta de tripanossomatídeos como sangue a fresco, esfregaço e gota espessa corados, além de método de concentração de Strout. Essas técnicas detectam diretamente formas tripomastigotas de *T. cruzi* circulantes no sangue e desta forma são consideradas padrão-ouro para o diagnóstico de fase aguda da doença de Chagas. Os testes foram realizados pelo LACEN-PE e SRDC - IAM/Fiocruz-PE.

Para o diagnóstico sorológico, testes imunoenzimáticos foram utilizados. O kit comercial GOLD ELISA (REM Indústrias e Comércio LTDA, São Paulo, Brasil) foi usado para detecção de anticorpos IgM anti-*T. cruzi*, sendo sua microplaca sensibilizada com antígenos de *T. cruzi*. O kit BIOLISA Chagas Recombinante (QUIBASA Química Básica Ltda, Minas Gerais, Brasil) que foi utilizado para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, contendo antígenos recombinantes revestidos em sua placa. A metodologia empregada seguiu as recomendações dos fabricantes. Os resultados foram interpretados como reagentes quando os testes apresentarem reatividade, não-reagentes quando não apresentarem reatividade, conforme o II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015 (DIAS et al., 2016). Todos os testes sorológicos foram realizados no SRDC - IAM/Fiocruz-PE.

6.9 Laudo de pesquisa

Um laudo de pesquisa direcionado ao diagnóstico por meio da técnica de qPCR (Anexo 1) foi disponibilizado ao médico solicitante, com o resultado obtido na qPCR para cada amostra testada, sendo considerados os resultados de dois sistemas de *primers* direcionados ao SAT-DNA de *T. cruzi*, conforme ilustrado no fluxograma a seguir (Figura 6).

Figura 7 - Fluxograma ilustrando os critérios para classificação dos resultados a serem descritos nos laudos de pesquisa disponibilizados aos médicos quanto aos resultados das qPCRs de amostras dos indivíduos expostos ao surto de doença de Chagas.



* Indicação de nova coleta para realização de novo teste.

Fonte: A autora, 2019.

6.10 Acompanhamento clínico-terapêutico dos pacientes submetidos ao tratamento etiológico

Os pacientes submetidos ao tratamento etiológico para a doença de Chagas foram acompanhados em três momentos de coleta, além da coleta inicial para diagnóstico (momento 0), para avaliação da evolução clínico-terapêutica. A primeira coleta para acompanhamento aconteceu ao final do mês de junho/2019, em média 1 mês após o início do tratamento; a segunda coleta ao final do mês de julho/2019, em média dois meses após o início do tratamento; e a terceira coleta no mês de novembro, aproximadamente 5 – 6 meses após o início do tratamento. Todos os pacientes enquadrados nesta etapa receberam a terapia convencional (Benzonidazol - produzido no Brasil pelo LAFEPE, como Benznidazol LAFEPE®), segundo recomendações médicas. Todas as amostras passaram ainda por teste de viabilidade, por meio da amplificação do gene G3PD, conforme protocolo descrito por Gonçalves et al. (2012).

6.11 Análise dos resultados

Os parâmetros de sensibilidade e especificidade foram calculados utilizando uma tabela de dupla entrada relacionando o diagnóstico da doença e o resultado do

teste (QUADRO 2) (FERREIRA; ÁVILA, 2001). A sensibilidade (S) e especificidade (E) foram determinados através das seguintes fórmulas:

$$S = \frac{A}{A + C} \qquad E = \frac{D}{B + D}$$

Todos os cálculos foram realizados com o auxílio de calculadora estatística *online* (<https://www.openepi.com/DiagnosticTest/DiagnosticTest.htm>).

Quadro 2 - Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.

TESTES	DOENÇA – Diagnóstico verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiros positivos A	Falsos positivos B
Negativo	Falsos negativos C	Verdadeiros negativos D

Fonte: Ferreira e Ávila (2001)

Para a análise estatística foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007) no qual foram determinadas a sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia, e indicador de *Kappa* (k), sendo estes resultados classificados segundo a interpretação sugerida por Landis e Koch (1977), considerando: k < 0.0, concordância insignificante; k= 0.0-0.20, concordância ruim; k= 0.21-0.40, concordância razoável; k= 0.41-0.60, concordância moderada; k= 0.61-0.80, forte concordância; e k= 0.81-1.00, ótima concordância entre os testes. Foi utilizada também estatística descritiva.

As análises foram realizadas relacionando os resultados entre o sistema de *primers* desenvolvido nesta pesquisa e os testes parasitológicos diretos e sorologia IgM anti-*T. cruzi* para o diagnóstico da doença de Chagas (DIAS et al., 2016), bem como entre o sistema *primers* e os critérios estabelecidos para a definição dos casos pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco (SES/PE).

7 ASPÉCTOS ÉTICOS

O presente trabalho utilizou amostras de Biorrepositório do Serviço de Referência em Doença de Chagas, sob responsabilidade da coordenação do SRDC. Esta pesquisa obteve aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães, com parecer número CAAE: 07178819.8.0000.5190.

Figura 9 - Alinhamento de múltiplas seqüências do kDNA de *Trypanosoma cruzi*, por meio do software Mega (versão 7.1).

	← Base 1140	Base 1160 →
1. M18816.1 <i>T. cruzi</i> kinetoplast	TGTAAATATAGGCAT	TGGTCTGAGTTGTG
2. M15511.1 <i>T. cruzi</i> kinetoplast	TGTAAATATAGGCCGT	GGGTGTGAGTATAG
3. M15512.1 <i>T. cruzi</i> kinetoplast	TGTAAATATAGGCCGT	GGGTGTGAGTATAG
4. M18814.1 <i>T. cruzi</i> kinetoplast	TGTAAATATAGGCACCTATGTGTGAGTTGGAGGGGTGTATAGTATAATAGTTTATGATTGAG	
5. M18815.1 <i>T. cruzi</i> kinetoplast	TGTAAATATAGACGGTTGGATTATATTGATTAAAATCTAT	TCTATGTAATTCGTAG
6. X04680.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	TGTAAATATAGGCTGGTGAACCTATGTGGGTGTAAGTGGGG	TGTGTTGTATAG
7. AY490900.1 <i>Trypanosoma cr</i>	TTACCGCTGGGCAT	TGGTCCC

Fonte: A autora, 2019.

Legenda: Verde: Adenina (A). Azul: Citosina (C). Roxo: Guanina (G). Vermelho: Timina (T). Em destaque a seqüência referente ao *primer* TcB1. *T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*. Base 1140/1160: referente a posição da base na seqüência. Os códigos M18816.1/M15511.1/M15512.1/ M18814.1/ M18815.1/ X04680.1/AY490900 são referentes ao número de acesso (Acession:) da seqüência no GenBank.

Figura 10 - Alinhamento de múltiplas seqüências do kDNA de *Trypanosoma cruzi*, por meio do software Mega (versão 7.1).

	← Base 1108	Base 1125 →
1. M18816.1 <i>T. cruzi</i> kinetoplast	GATTTTTCACGGGAGGTTGGGGTTTCGATTGG	GGTTGGTGTAAATATAAGGC
2. M15511.1 <i>T. cruzi</i> kinetoplast	GGAAATTTTCGGGGAGGTTGGGGTTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATAAGGC	
3. M15512.1 <i>T. cruzi</i> kinetoplast	GGAAATTTTCGGGGAGGTTGGGGTTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATAAGGC	
4. M18814.1 <i>T. cruzi</i> kinetoplast	GGTTGTTTTACGGGAGGTTGGGGTTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATAAGGC	
5. M18815.1 <i>T. cruzi</i> kinetoplast	GATTTTTCACGGGGAGGTTGGGGTTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATAAGAC	
6. AY490900.1 <i>Trypanosoma cr</i>		GACTAGTTACCGCGTGGGC

Fonte: A autora, 2019.

Legenda: Verde: Adenina (A). Azul: Citosina (C). Roxo: Guanina (G). Vermelho: Timina (T). Em destaque a seqüência referente ao *primer* CzB1. *T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*. Base 1108/1125: referente a posição da base na seqüência. Os códigos M18816.1/GU059342.1/X55570.1/AB678348.1/AF231100.1/HQ585885.1/KC492156.1/KX098514.1 são referentes ao número de acesso (Acession:) da seqüência no GenBank.

Figura 11 - Alinhamento de múltiplas seqüências do SAT-DNA de *Trypanosoma cruzi*, por meio do software Mega (versão 7.1).

	← Base 04	Base 23 →
1. GU059342.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> strain	GC	AAATTTCCTCCAAGCAGCGGATAGTTTCAAGGT
2. NW_001849576.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	GAAATACATCGATATA	CAAGCAAAAGTAATACGTCAATCCGCATAATC
3. AY520024.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> clone	GAGCTCC	TGCCACAAAGGTTGCTCCACTCCGCCGATCGTTTTCGAG

Fonte: A autora, 2019.

Legenda: Verde: Adenina (A). Azul: Citosina (C). Roxo: Guanina (G). Vermelho: Timina (T). Em destaque para a seqüência referente ao *primer* TcSAT1. Base 04/23: referente a posição da base na seqüência. Os códigos GU059342.1/NW_001849576.1//AY520024.1 são referentes ao número de acesso (Acession:) da seqüência no GenBank.

Quadro 3 - Sistemas de *primers* desenhados para detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*.

Alvo	Sistema	Primers	Sequência dos <i>primers</i>	Base s	Tamanho do produto	% CG	T _m
kDNA	TcB	TcB1	F 5'AGGCATTGGTCTGAGTTGTGT3'	21	174	48	52,4°
		TcB2	R 5'ACACCAATACCTACCACCACTT3'	22		45	53°
	CzB	CzB1	F 5'AGGTGGGGGTTTCGATTGG3'	18	200	61	52,6°
		CzB2	R 5'CCTACCACCACTTAAATACAG3'	22		43	50,5°
SAT-DNA	TcSAT-IAM	TcSAT1	F 5'AAATTCCTCCAAGCAGCGGA3'	20	101	50	51,8°
		TcSAT2	R 5'ATGAATGGCGGGAGTCAGAG3'	20		55	53,8°

Fonte: A autora, 2019

Legenda: kDNA: DNA do cinetoplasto. SAT-DNA: DNA satélite. F: *foward*. R: *reverse*. %CG: Percentual de bases citosina (C) e guanina (G). T_m: Temperatura de *melting*.

Ao ser realizado o BLAST das sequências dos sistemas de *primers* TcB e CzB observou-se que a porcentagem para a cobertura e identidade das sequências foi de 100% com relação ao *T. cruzi*. O mesmo resultado foi obtido quando realizado o BLAST para as sequências do TcSAT-IAM. Para todos os sistemas, foi inexistente a cobertura e identidade para outros tripanossomatídeos.

8.2 Testes iniciais dos sistemas de *primers* e padronização das condições de reação da PCR em tempo real

Inicialmente, todos os sistemas de *primers* desenvolvidos nesse estudo (TcB, CzB e TcSAT-IAM), bem como os sistemas preditos na literatura (TCZ e *Cruzi*, desenvolvidos por Moser et al. 1989 e Píron et al. 2007, respectivamente) foram testados em experimento preliminar.

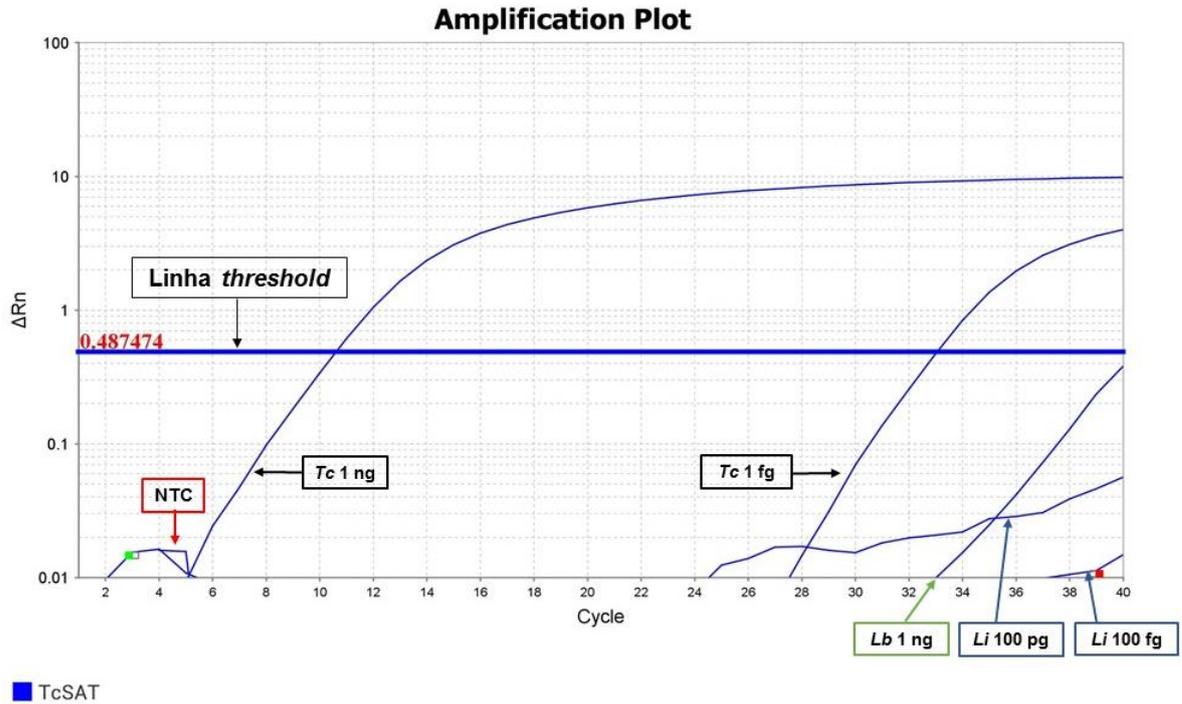
Os sistemas TcB e CzB, ambos para o kDNA de *T. cruzi*, não apresentaram amplificação para nenhuma das concentrações de DNA à que foram testados. Estes foram excluídos da pesquisa, por não se mostrarem sensíveis na detecção do alvo.

Os sistemas TcSAT-IAM, *Cruzi* e TCZ, ambos direcionados ao SAT-DNA de *T. cruzi*, foram testados. Para o primeiro sistema todas as concentrações de DNA parasitário testadas (1ng – 1fg) obtiveram amplificação, com limite de detecção de 1fg; as amostras de NTC deste sistema não apresentaram amplificação. Para o segundo sistema, os mesmos resultados foram alcançados, com limite de detecção de 1fg, bem como não havendo amplificação do controle negativo. Para o terceiro e

último sistema testado para o alvo, o limite de detecção apresentado foi de 100pg; as amostras de controle negativo apresentaram amplificação. Devido a isto, o sistema TCZ foi então submetido à nova PCR, desta vez com *primers* nas concentrações de 3 e 4 pmol/ μ L, visando testar se a amplificação da amostra sem DNA poderia ser proveniente de dímeros de *primers*, bem como testar mais uma vez o seu limite de detecção. As concentrações de 1ng – 1 fg e amostras sem DNA foram novamente testadas. Após análise, verificou-se que as amostras de controle negativo continuavam a apresentar ampliações, com Temperatura de *melting* similar a das amostras da curva. Uma vez que os demais sistemas testados para o alvo SAT-DNA apresentaram resultados mais promissores, o sistema TCZ foi excluído da pesquisa.

Seguindo, os sistemas TcSAT-IAM (Figura 8) e Cruzei (Figura 9) passaram à etapa de especificidade. O sistema TcSAT-IAM não apresentou amplificação acima do limiar de detecção para o DNA de *Leishmania* spp. O sistema Cruzei apresentou ampliações tardias para as amostras de *Leishmania* spp. Desta forma, foi aplicado o cálculo de especificidade, onde os resultados obtidos mostraram que o sistema é aproximadamente $10^{7,12}$ vezes mais específico para o alvo do que para *L. braziliensis*, bem como aproximadamente $10^{6,8}$ vezes mais específicos para o alvo que para o DNA de *L.infantum*.

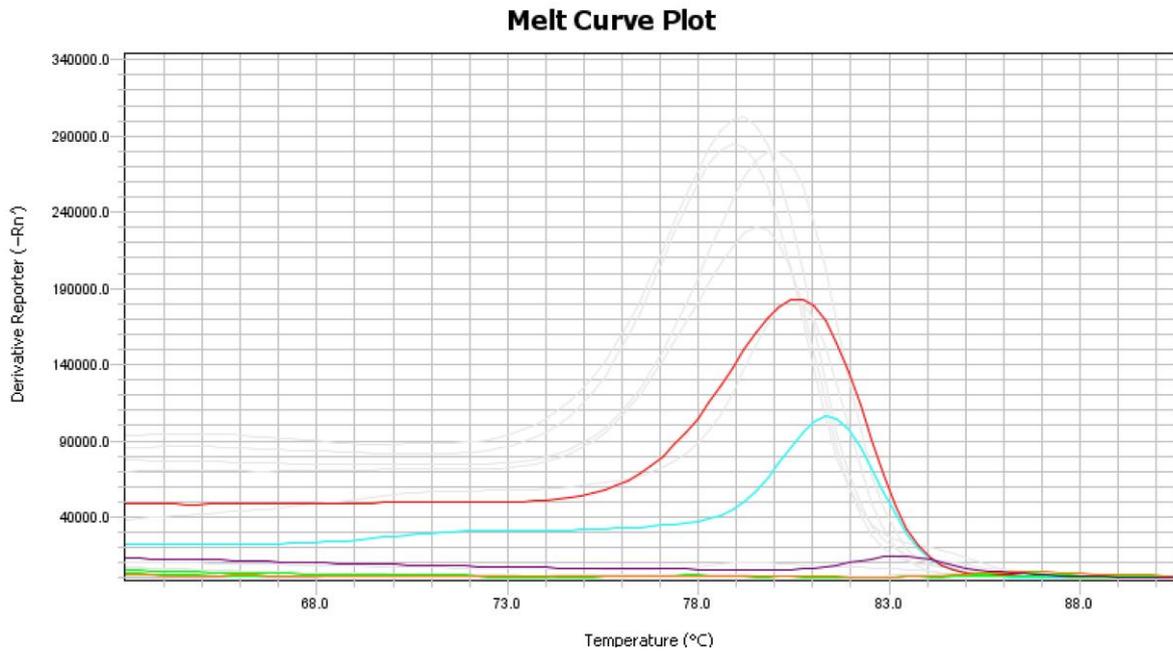
Figura 12 - Curva de amplificação do teste de especificidade para o sistema TcSAT-IAM.



Fonte: A autora, 2019.

Legenda: *Tc*: *Trypanosoma cruzi*. *Li*: *Leishmania infantum* *Lb*: *Leishmania braziliensis*. ng: Nanograma. pg: Picograma. fg: Fentograma. NTC: Controle negativo (amostra sem DNA).

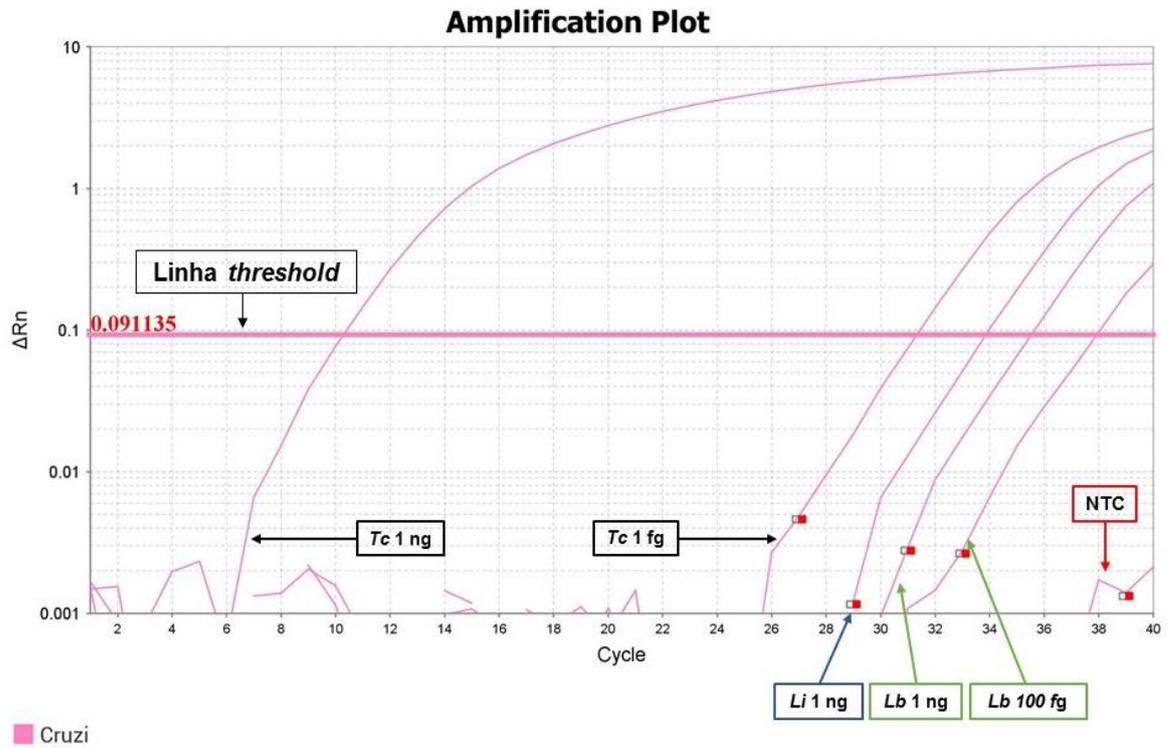
Figura 13 - Curva de *melting* do teste de especificidade para o sistema TcSAT-IAM.



Fonte: A autora, 2019.

Legenda: Linha vermelha: amostra de 1ng de DNA de *Trypanosoma cruzi*. Linha azul: amostra de 1fg de DNA de *Trypanosoma cruzi*. Linha laranja: amostra de 1ng de DNA de *Leishmania infantum*. Linha roxa: amostra de 1ng de DNA de *Leishmania braziliensis*. Linha verde: amostra controle negativo (NTC - amostra sem DNA).

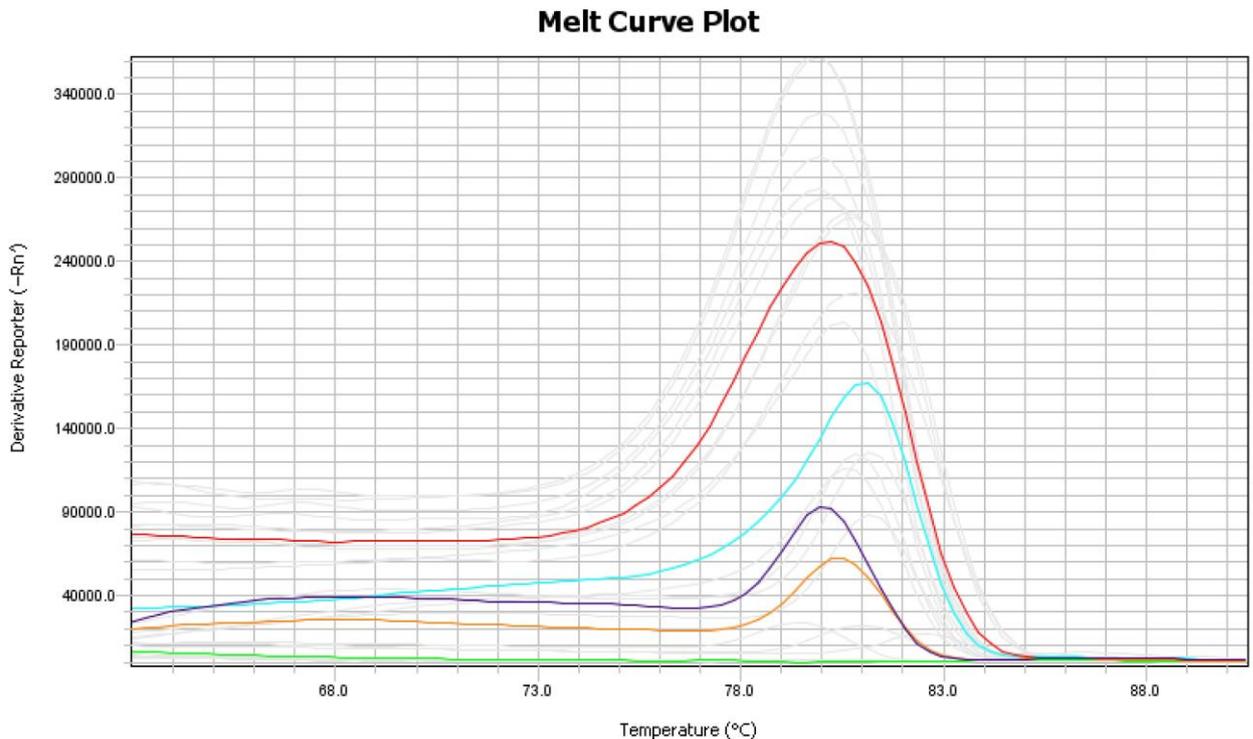
Figura 14 - Curva de amplificação para o teste de especificidade para o sistema Cruzi.



Fonte: A autora, 2019.

Legenda: Tc: *Trypanosoma cruzi*. Li: *Leishmania infantum* Lb: *Leishmania braziliensis*. ng: Nanograma. fg: Fentograma. NTC: Controle negativo (amostra sem DNA).

Figura 15 - Curva de *melting* para o teste de especificidade para o sistema Cruzei.



Fonte: Adaptada da *QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.4.3.*

Legenda: Linha vermelha: amostra de 1ng de DNA de *Trypanosoma cruzi*. Linha azul: amostra de 1fg de DNA de *Trypanosoma cruzi*. Linha laranja: amostra de 1ng de DNA de *Leishmania infantum*. Linha roxa: amostra de 1ng de DNA de *Leishmania braziliensis*. Linha verde: amostra controle negativo (NTC - amostra sem DNA).

Os sistemas TcSAT-IAM e Cruzei apresentaram altas sensibilidade, detectando até 1 fg de DNA parasitário (equivalente a cerca de 0,003 parasitos/reacção), e eficiência, de aproximadamente 94%, na detecção do DNA de *T. cruzi*.

8.3 Avaliação da reprodutibilidade

Conforme item 6.5, a análise de reprodutibilidade através do CV intra-ensaio para o sistema TcSAT-IAM foi de 4,75% (0,5 fg/μL), 7,06% (5 fg/μL), 2,11% (50 fg/μL) e 1,03% (0,5 pg/μL). Para o sistema Cruzei o CV foi de 4,28% (0,5 fg/μL), 7,92% (5 fg/μL), 3,68% (50 fg/μL) e 3,39% (0,5 pg/μL). O CV inter-ensaio obtido para o sistema TcSAT-IAM foi de 6,37% (0,5 fg/μL), 6,79% (5 fg/μL), 3,50% (50 fg/μL) e 4,69% (0,5 pg/μL). Para o sistema Cruzei o CV foi de 7,93% (0,5 fg/μL), 9,43% (5 fg/μL), 1,68% (50 fg/μL) e 1,75% (0,5 pg/μL). Diante dos valores expostos, estes apresentaram uma baixa dispersão, significando que os dados são homogêneos.

8.4 Teste em amostras

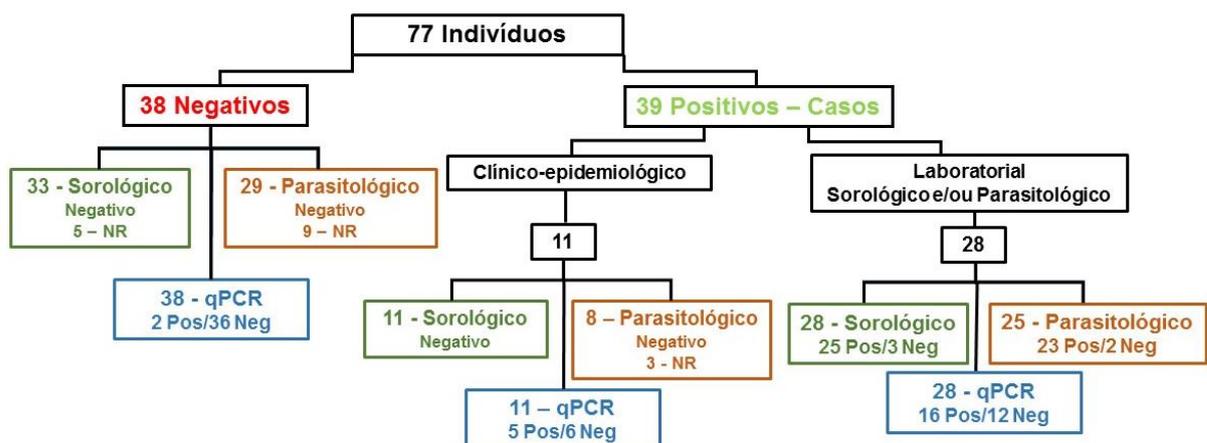
Os resultados das amostras dos 77 indivíduos expostos ao surto de DC são apresentados a seguir.

8.4.1 Caracterização amostral

Dentre os 77 indivíduos expostos ao surto de DC, 40 eram do sexo feminino e 37 do sexo masculino, com média de idade de 34 anos e, deste total, 39 foram considerados CASOS para a infecção pelo *T. cruzi*, segundo dados da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco (SES/PE). A classificação dos indivíduos foi confirmada através de critérios Clínico-epidemiológico (sem exames laboratoriais positivos, porém com sinais clínicos indicativos de infecção pelo *T. cruzi*) ou Laboratorial (com diagnósticos parasitológico e/ou sorológico positivos para a infecção pelo *T. cruzi*).

Um fluxograma ilustrando os métodos diagnósticos utilizados para classificação dos indivíduos expostos ao surto de DC é demonstrado a seguir (Figura 16).

Figura 16 - Fluxograma ilustrando o diagnóstico dos indivíduos expostos ao surto de doença de Chagas, considerando critérios diagnósticos adotados pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco.



Fonte: A autora, 2019.

Legenda: Pos: Positivo. Neg: Negativo. NR: Não realizado

No quadro 4 está descrita a sintomatologia notificada dos 39 casos confirmados, bem como a classificação dos pacientes dentro dos critérios estabelecidos pela SES/PE.

Quadro 4 – Sintomatologia notificada e classificação dos pacientes dentre os critérios Laboratorial e Clínico-epidemiológico pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco.

Paciente	Critério*	Sintomatologia																		
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	
1	C.E.		X																	
2	LAB (Sor)	X																		
3	LAB (Sor/Par)		X			X														
4	C.E.				X			X				X								
5	LAB (Sor)		X			X	X										X	X		
6**	LAB (Par)																			
7	LAB (Sor/Par)		X			X		X	X										X	
8	C.E.				X	X									X	X			X	
9	LAB (Sor/Par)		X			X		X						X	X				X	
10	LAB (Sor/Par)		X			X														
11	LAB (Sor)		X			X	X						X						X	
12**	LAB (Sor)																			
13	LAB (Sor)		X	X				X		X									X	
14	LAB (Sor)		X					X	X	X			X						X	
15	C.E.		X																X	
16	LAB (Sor/Par)		X	X	X										X				X	
17	LAB (Sor/Par)	X																		
18	LAB (Sor/Par)		X					X		X			X						X	
19	LAB (Sor/Par)		X	X				X		X			X			X			X	
20	LAB (Sor/Par)		X					X											X	
21	LAB (Sor/Par)		X	X															X	X
22	C.E.	X																		
23	LAB (Sor/Par)		X										X	X	X					
24	LAB (Sor/Par)		X		X	X	X		X			X							X	
25	LAB (Sor/Par)			X		X									X				X	X
26	C.E.		X	X															X	
27	C.E.	X																		
28	C.E.				X															
29	LAB (Sor/Par)		X		X	X	X			X		X							X	
30	LAB (Sor/Par)		X	X	X	X	X			X									X	
31	LAB (Par)			X											X					
32	LAB (Sor/Par)		X	X				X			X				X				X	
33	C.E.		X	X		X	X							X	X				X	
34	LAB (Sor/Par)		X	X	X															
35	C.E.	X																		
36	LAB (Sor)		X	X	X												X		X	
37	C.E.				X										X					
38	LAB (Par)		X	X	X	X									X				X	
39	LAB (Sor/Par)		X		X	X	X								X				X	

Fonte: A autora, 2019.

Legenda: LAB.: Laboratorial. Sor: Positivo para teste sorológico. Par: Positivo para teste parasitológico. C.E.: Clínico-epidemiológico. *: Critério estabelecido pelo Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco para os casos de doença de Chagas do surto ocorrido em Ibimirim/PE. **: Paciente sem sintomatologia descrita. A: Assintomático. B: Febre. C: Cefaleia. D: Dor abdominal/Diarreia. E: Edema. F: Arritmias. G: Esplenomegalia H: Hepatomegalia. I: Eritema/Exantema. J: Prostração. K: Sinais de Insuficiência Cardíaca (ICC). L: Dor articular. M: Mialgias. N: Náuseas/Vômito. O: Sudorese/Calafrios. P: Palpitação. Q: Astenia. R: Dor no corpo.

8.4.2 Análises dos resultados do sistema TcSAT-IAM em comparação aos dos critérios estabelecidos pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco para diagnóstico dos casos

Uma análise comparativa foi realizada, relacionando os dados obtidos seguindo os critérios da SES/PE e os resultados da qPCR pelo sistema TcSAT-IAM (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados dos critérios diagnósticos considerados pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco, em comparação aos do sistema de *primers* TcSAT-IAM para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*.

TcSAT	Critérios SES/PE		
	+	-	
+	21	2	23
-	18	36	54
Total	39	38	77
Kappa	0,4832		
Valor de p	< 0,0001		

Fonte: A autora, 2019.

Levando em consideração os resultados dos 39 pacientes classificados pela SES/PE, a sensibilidade do sistema TcSAT-IAM foi de 53,85%, com intervalo de confiança (IC) inferior 38,57 e superior 68,43, e a especificidade foi de 94,74% (IC inferior 82,71 e superior 98,54); valores preditivos positivo e negativo de 91,3% e 66,67%, respectivamente; acurácia de 74% e concordância considerada moderada, segundo Landis e Koch (1977).

Uma análise comparativa entre os dados obtidos a partir do critério laboratorial em relação aos dados da qPCR pelo sistema TcSAT-IAM, também foi realizada (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados do critério laboratorial - Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco, em comparação aos do sistema de *primers* TcSAT-IAM para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*.

TcSAT-IAM	Critério Laboratorial		
	+	-	
+	16	7	23
-	12	42	54
Total	28	49	77
Kappa	0,4456		
Valor de p	< 0,0001		

Fonte: A autora, 2019.

Levando em consideração os resultados dos 28 casos segundo os critérios laboratoriais utilizados pela SES/PE, a sensibilidade e a especificidade do sistema TcSAT-IAM foram de 57,14% (IC inferior 39.07 e superior 73.49) e 85,71% (IC inferior 73.33 e superior 92.9), respectivamente; valores preditivos positivo e negativo de 69,57% e 77,78%, respectivamente; acurácia de 75,32% e concordância considerada moderada, segundo Landis e Koch (1977).

Desses 28 pacientes, 16 obtiveram qPCR positiva, concordando com resultados dos testes parasitológicos diretos e sorologia IgM anti-*T. cruzi*.

Quando considerado apenas os resultados das amostras de pacientes classificados pelo critério laboratorial da SES/PE, que foram coletadas antes ou até 3 dias após implementação do tratamento etiológico para DC, as análises demonstraram que, dos 13 pacientes que se enquadraram nesta análise, 100% apresentaram concordância dentre os resultados de qPCR e critério laboratorial (Quadro 5).

Quadro 5. Análise de concordância dos resultados de pacientes classificados pelo critério laboratorial com amostras coletadas para PCR em tempo real antes ou até 3 dias pós-início de tratamento etiológico para doença de Chagas.

Paciente	Cp (fg/ μ L) – Momento 0	Dias de tratamento
2	8,32 fg	0
3	99,5 fg	2
5	14.346,68 fg	1
7	2.975,95 fg	2
9	1.297,16 fg	2
10	151,55 fg	3
16	6.033,75 fg	3
17	4.716,02 fg	2
18	2.926,35 fg	0
21	7.475,6 fg	1
24	281,46 fg	2
30	2.214,47 fg	3
34	3.381,64 fg	0

Fonte: A autora, 2019.

Legenda: Cp: Carga parasitária. fg: Fentograma

Considerando os 11 casos classificados pelo critério clínico-epidemiológico, todos os que foram submetidos aos testes sorológicos e/ou parasitológicos obtiveram resultados negativos. No entanto, todos os pacientes enquadrados nesse critério tiveram amostras submetidas à qPCR, tendo 5 (45,45%) deles obtido resultados positivos, e 6 (54,54%) resultados negativos para a detecção do DNA de

T. cruzi pelo sistema TcSAT-IAM sendo que, destas, 2 já haviam iniciado a terapia antiparasitária há pelo menos 8 dias (Quadro 6).

Quadro 6. Análise dos resultados de pacientes classificados pelo critério clínico-epidemiológico com amostra coletadas para PCR em tempo real e informações quanto ao tratamento etiológico para doença de Chagas.

Paciente	Cp (fg/ μ L) – Momento 0	Dias de tratamento
1	18,5 fg	1
4	15,83 fg	0
8	10,57 fg	*
15	-	8
22	-	0
26	-	0
27	22,65 fg	0
28	-	0
33	-	0
35	22,77 fg	0
37	-	20

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Legenda: Cp: Carga parasitária. fg: Fentograma. -: negativo para detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*. *: sem informação de início de tratamento.

8.4.3 Avaliação do sistema TcSAT-IAM em relação aos dos testes parasitológicos diretos e sorologia IgM anti-*T. cruzi* para o diagnóstico da doença de Chagas, conforme II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas

Os resultados entre o sistema TcSAT-IAM e testes parasitológico (Tabela 3) e entre TcSAT-IAM e sorologia IgM anti-*T. cruzi* (Tabela 4) são demonstrados a seguir.

Tabela 3 – Resultados do diagnóstico parasitológico em comparação aos do sistema de qPCR TcSAT-IAM para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*.

TcSAT	Parasitológico		
	+	-	
+	13	7	20
-	10	32	42
Total	23	39	62
Kappa	0,3963		
Valor de p	0,0008		

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 4 – Resultados da sorologia IgM anti-*T. cruzi* em comparação aos do sistema de qPCR TcSAT-IAM para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*.

TcSAT-IAM	Sorologia		
	+	-	
+	15	8	23
-	10	39	49
Total	25	47	72
Kappa	0,438		
Valor de p	< 0.0001		

Fonte: A autora, 2019.

Para o sistema TcSAT-IAM a sensibilidade e a especificidade foram de 56,52% (IC inferior 36,81 e superior 74,37) e 82,05% (IC inferior 67,33 e superior 91,02), respectivamente, apresentando acurácia de 72,58%, e valores preditivos positivo e negativo 65% e 76,19%, respectivamente, com concordância considerada razoável, segundo Landis e Koch (1977), em relação ao diagnóstico parasitológico. Relacionando o mesmo sistema ao diagnóstico sorológico por detecção de anticorpos IgM anti-*T. cruzi*, os resultados de sensibilidade e especificidade foram de 60% (IC inferior 40,74 e superior 76,6) e 82,98% (IC inferior 69,86 e superior 91,11), respectivamente, com acurácia de 75% e valores preditivos positivo e negativo 65,22% e 79,59%, respectivamente, com concordância considerada moderada segundo Landis e Koch (1977).

8.4.4 Sistema Cruzii: análise de concordância com o sistema TcSAT-IAM e comparação com critérios diagnósticos estabelecidos pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco

Das amostras de sangue dos 77 indivíduos expostos ao surto de DC, 69 (89,61%) obtiveram resultados concordantes entre os dois sistemas testados, TcSAT-IAM e Cruzii (PÍRON et al., 2007), sendo 50 amostras negativas e 19 amostras positivas para ambos os sistemas. Três amostras obtiveram resultado positivo para detecção do DNA de *T. cruzi* apenas pelo sistema TcSAT-IAM, enquanto 5 amostras obtiveram resultado positivo apenas para o sistema Cruzii.

Após análises, em 19 amostras o laudo de pesquisa ofertado possuiu resultado positivo para a detecção de DNA do parasito, 8 amostras obtiveram laudo com resultado inconclusivo para a detecção de DNA parasitário e 50 amostras apresentaram laudo de resultado negativo para a detecção de DNA de *T. cruzi*.

Uma análise comparativa entre os dados obtidos seguindo os critérios da SES/PE e os obtidos com o sistema Cruzei foi realizada, como demonstrada a seguir (Tabela 5).

Tabela 5 – Tabela de dupla entrada relacionando os resultados do critério laboratorial, considerado pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco, em comparação aos do sistema de Cruzei para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*.

Cruzei	Critério Laboratorial		
	+	-	
+	19	4	23
-	20	34	54
Total	39	38	77
Kappa	0,3799		
Valor de p	0,0001		

Fonte: A autora, 2019.

Para o sistema Cruzei a sensibilidade e a especificidade foram de 48,72% (IC inferior 33,86 e superior 63,8) e 89,47% (IC inferior 75,87 e superior 95,83), respectivamente, em relação aos critérios para classificação dos casos pela SES/PE, com acurácia de 68,83% e valores preditivos positivo e negativo de 82,61% e 62,96%, respectivamente, tendo uma concordância considerada razoável, segundo Landis e Koch (1977).

Uma análise comparativa entre os dados obtidos a partir do critério laboratorial em relação aos dados da qPCR pelo sistema Cruzei também foi realizada (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados do critério laboratorial - Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco, em comparação aos do sistema Cruzei para a detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi*.

Cruzei	Critério Laboratorial		
	+	-	
+	16	7	23
-	12	42	54
Total	28	49	77
Kappa	0,4456		
Valor de p	< 0,0001		

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Considerando os resultados dos 28 indivíduos classificados como Casos pelo critério laboratorial pela SES/PE, a sensibilidade e a especificidade do sistema Cruzei foram de 57,14% (IC inferior 39,07 e superior 73,49) e 85,71% (IC inferior 73,33 e superior 92,9), respectivamente; valores preditivos positivo e negativo de 69,57% e

77,78%, respectivamente; acurácia de 75,32% e concordância considerada moderada segundo Landis e Koch (1977), assim como os apresentados pelo sistema TcSAT-IAM.

Considerando os 11 casos classificados pelo critério clínico-epidemiológico (sem testes sorológicos e/ou parasitológicos positivos), 3 (27,27%) deles obtiveram resultados positivos e 8 (72,73%) resultados negativos para a detecção do DNA de *T. cruzi* pelo sistema Cruzei.

8.4.5 Avaliação de outros espécimes clínicos

Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e sêmen precedentes de alguns dos indivíduos expostos ao surto também foram testadas, sendo aplicadas ao sistema TcSAT-IAM.

Uma amostra de LCR foi submetida à qPCR pelo sistema, obtendo resultado negativo para detecção do DNA de *T. cruzi*.

De um total de 6 amostras de sêmen de indivíduos envolvidos no surto, 1 obteve resultado positivo para detecção do DNA de *T. cruzi* pelo sistema TcSAT-IAM, enquanto, num total de 5 amostras, o resultado foi negativo.

8.5 Acompanhamento clínico-terapêutico por PCR em tempo real em pacientes submetidos ao tratamento etiológico para doença de Chagas

Inicialmente, 44 indivíduos foram submetidos ao tratamento para a doença de Chagas. Contudo, 5 destes indivíduos não apresentavam diagnóstico reagente pelos testes parasitológicos diretos e sorologia IgM anti-*T. cruzi*, ou sintomatologia coincidente com a infecção pelo *T. cruzi*, tendo tratamento iniciado com base em critérios médicos. Quando realizada a qPCR em amostras destes indivíduos, devido a não detecção do DNA de *T. cruzi*, o tratamento foi suspenso e tais indivíduos retirados da lista de casos.

Os 39 pacientes submetidos ao tratamento etiológico foram acompanhados nesta pesquisa. No quadro 6 pode-se observar a comparação da carga parasitária dentre os pacientes acompanhados após início do tratamento etiológico.

Quadro 7. Acompanhamento de carga parasitária e evolução clínico-terapêutica por meio de PCR em tempo real dos pacientes do surto de doença de Chagas.

Paciente	Cp (fg) – Coleta Momento 0	Cp (fg) – Coleta 1 pós-tratamento	Cp (fg) – Coleta 2 pós-tratamento	Cp (fg) – Coleta 3 pós-tratamento
1	18,5	-	-	-
2	8,32	*	-	-
3	99,5	-	-	-
4	15,83	*	-	-
5	14.346,68	-	-	*
6	-	20,5	-	-
7	2.975,95	17,63	-	-
8	10,57	*	-	*
9	1.297,16	-	-	-
10	151,55	8,12	-	-
11	381,86	2,36	-	-
12	-	-	-	-
13	-	*	-	-
14	80,99	6,27	-	-
15	-	*	-	-
16	6.033,75	-	-	-
17	4.716,02	-	-	-
18	2.926,35	-	-	*
19	-	*	-	-
20	-	*	-	-
21	7.475,6	-	-	-
22	-	*	-	*
23	-	*	-	-
24	281,46	*	-	-
25	-	*	-	-
26	-	*	-	*
27	22,65	-	-	-
28	-	*	-	-
29	-	*	-	-
30	2.214,47	-	-	-
31	-	*	-	-
32	-	*	-	-
33	-	*	-	*
34	3.381,64	-	-	-
35	22,77	-	-	-
36	-	*	-	-
37	-	*	-	-
38	-	*	-	-
39	-	*	*	*

Fonte: A autora, 2019

Legenda: Cp: Carga parasitária; -: sem carga parasitária detectável; *: não foi realizado teste de acompanhamento; fg: Fentograma. Momento 0: primeira coleta/coleta para diagnóstico.

Na primeira coleta de acompanhamento de carga parasitária, das 18 amostras coletadas, 4 (22,22%) apresentaram resultados positivos para a detecção do DNA de *T. cruzi*, com redução de carga parasitária em relação à primeira coleta (coleta para diagnóstico), enquanto 1 amostra que não possuía positividade na primeira coleta, obteve positividade neste momento; apresentando, no entanto, uma baixa carga parasitária. As 13 amostras (72,22%) restantes obtiveram resultado

negativo para detecção do DNA de *T. cruzi*. A partir da segunda coleta de acompanhamento observou-se, por meio da qPCR, a negatização de carga parasitária detectável em todas as amostras testadas.

9 DISCUSSÃO

No presente estudo, sistemas de *primers* visando à detecção do DNA de *T. cruzi* foram desenvolvidos e testados quanto a sua sensibilidade e especificidade. Duffy et al. (2009) indicam que o DNA nuclear de *T. cruzi* é altamente conservado, favorecendo sua utilização para qPCR; o que está de acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, em que os sistemas utilizados para o alvo apresentaram resultados promissores, indicando a possibilidade de utilização destes na rotina diagnóstica para a doença de Chagas.

Durante a otimização dos sistemas, os *primers* Cruzi 1 e 2 apresentaram altas sensibilidade e eficiência na detecção do SAT-DNA de *T. cruzi*. Estudos utilizando os mesmos *primers* corroboram com tal perspectiva, indicando que o sistema citado pode ser utilizado no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, por meio da técnica de qPCR (ABRAS et al., 2018). Do mesmo modo o sistema de *primers* TcSAT-IAM, aqui desenvolvido, apresentou resultados equivalentes ou mesmo superiores ao do sistema supracitado tendo em vista que, durante a etapa de otimização dos dois sistemas de diagnóstico molecular em teste, não foram identificadas amplificações para o DNA de outros tripanossomatídeos pelo sistema desenvolvido neste estudo, enquanto que, para o sistema da literatura, amplificações tardias para o DNA de *Leishmania* spp. foram observadas. Tais sistemas alcançaram detecção de até 1 fg de DNA parasitário, o que equivale 0,003% do DNA de um parasito; enquanto os sistemas desenvolvidos e testados para o kDNA de *T. cruzi* não apresentaram amplificação. Estes resultados podem ser justificados devido ao fato do DNA presente no cinetoplasto se apresentar de maneira catenada, o que pressupõe a necessidade de revisão do processo de aquisição desse DNA (BRITTO et al., 1993; TEIXEIRA et al., 2011).

Todos os indivíduos expostos ao surto tiveram amostras submetidas à qPCR por ambos os sistemas de *primers* predito na literatura e desenvolvido neste estudo (Cruzi e TcSAT-IAM, respectivamente). Devido à necessidade de atendimento aos participantes do evento e almejando maior confiabilidade nos resultados, optou-se por ofertar um laudo de pesquisa com o resultado dos dois sistemas de *primers* citados. Estes laudos de pesquisa ofertados, com os resultados dos testes moleculares, puderam auxiliar os médicos em suas tomadas de decisão, tendo em

vista que parte dos indivíduos não possuía exames laboratoriais por outras técnicas diagnósticas.

Após análises dos testes moleculares em amostras de sangue, foi evidenciado que o sistema TcSAT-IAM apresentou, neste estudo, resultados superiores que os do sistema Cruzi, no qual o primeiro demonstrou concordância moderada e o segundo obteve concordância razoável (LANDIS; KOCH, 1977). Comparando valores de sensibilidade, especificidade e acurácia de cada um dos sistemas em relação aos 39 casos considerados dentro dos critérios diagnósticos estabelecidos pela SES/PE, o TcSAT-IAM também obteve resultados superiores (53,85%, 94,74% e 74%, respectivamente, enquanto o Cruzi apresentou 48,72%, 89,47% e 68,83%, respectivamente). Assim, as análises seguiram com o sistema TcSAT-IAM sendo considerado como metodologia em teste a ser comparada com os testes parasitológicos e sorológicos para o diagnóstico da doença.

Avila et al. (1991) apontam que os testes sorológicos apresentam alta sensibilidade, mas carecem de especificidade, e que a PCR poderia ser utilizada como complemento para testes sorológicos. Em relação aos exames parasitológicos, a técnica é considerada operador-dependente, além da necessidade de experiência e formação continuada em microscopia, conforme a Portaria nº 57, de 30 de outubro de 2018, no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Chagas (BRASIL, 2018).

Neste estudo, 5 amostras de pacientes classificados pelo critério clínico-epidemiológico da SES/PE não obtiveram resultados positivos pelos métodos de diagnóstico parasitológicos diretos e sorologia IgM anti-*T. cruzi*, obtendo, contudo, resultados positivos na qPCR pelo sistema TcSAT-IAM, sendo estes concordantes com as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes. Ainda, dos 38 indivíduos negativos pelos critérios de classificação da SES/PE (não apresentando testes sorológicos e parasitológicos reagentes, bem como assintomáticos), 2 apresentaram qPCR positiva. O que possivelmente deve-se ao fato dessa ser uma técnica extremamente sensível (ABRAS et al, 2018), reforçando que o sistema utilizado nesta pesquisa demonstra possuir altas sensibilidade e especificidade na identificação do DNA de *T. cruzi*.

Em um surto de DC ocorrido ao final de 2017 no estado do Amazonas, 8 indivíduos que haviam consumido polpa de açaí possivelmente contaminado por *T. cruzi* foram avaliados clinicamente e tiveram amostras de sangue submetidas a

PCR, cultura e xenodiagnóstico, sendo estas duas últimas técnicas bem-sucedidas em 6 e 7 amostras, respectivamente; enquanto, para a PCR, todas as amostras obtiveram positividade (SANTANA et al., 2019). Tais dados corroboram com a importância de empregar uma tecnologia que demonstra tamanha sensibilidade ao diagnóstico de rotina.

Do total de 44 indivíduos inicialmente submetidos ao tratamento para a infecção pelo *T. cruzi*, 5 destes não apresentavam testes de diagnóstico parasitológico direto e sorologia IgM anti-*T. cruzi* com resultados positivos, bem como não apresentavam sintomatologia ou exames clínicos compatíveis com a infecção, tendo tratamento iniciado com base em sua participação no evento, além de outros critérios médicos considerados para a implementação terapêutica. A qPCR possuiu papel de extrema importância nesses casos, em especial, pelo fato de ter sido a metodologia diagnóstica que auxiliou na tomada de decisão dos médicos quanto a continuidade ou suspensão da terapia antiparasitária. É inegável a importância e confiabilidade de um teste de diagnóstico positivo por métodos parasitológicos. No entanto, a ausência de visualização do parasito na amostra testada pode não significar que o indivíduo suspeito esteja livre da infecção. Pérez-Molina e Molina (2018) afirmam que, geralmente, a técnica de PCR apresenta-se positiva dias ou até mesmo semanas antes da detecção parasitária no sangue.

É interessante observar as diferenças genéticas entre as diversas DTUs de *T. cruzi*, relacionadas à sua variabilidade biológica, e que este fato pode influenciar em divergências na parasitemia em humanos (BRITTO et al., 2009), e estudos que possam identificar essas variações e sua distribuição se mostram cada vez mais relevantes.

Além de amostras de sangue, 1 (2,56%) paciente com suspeita de comprometimento neurológico teve amostra de LCR submetida ao diagnóstico molecular. Após realização da técnica, as análises demonstraram que a amostra de LCR apresentou resultado negativo para a detecção do DNA de *T. cruzi*, ao passo que outras investigações clínicas também discordavam da hipótese diagnóstica, sendo a suspeita descartada pela equipe médica. Este resultado foi concordante com o resultado da qPCR da amostra de sangue deste indivíduo, que foi negativo. Finsterer e Auer (2013) indicam que o comprometimento cerebral por parasitos é uma importante manifestação clínica em grande parte das parasitoses que afetam humanos, estando a infecção pelo *T. cruzi* incluída neste grupo. Fica et al. (2017)

apontam que a análise de LCR pela técnica molecular tem sido pouco avaliada sendo, contudo, uma nova abordagem que possui significativo valor diagnóstico.

Amostras de sêmen de 6 (15,38%) indivíduos também foram testadas pela qPCR. Dentre estas, 1 (16,66%) apresentou resultado positivo para a detecção do *T. cruzi* no espécime testado. Do total de indivíduos com amostras de sêmen testadas, 2 apresentaram qPCR positiva em amostras de sangue total, além de apresentarem positividade no teste parasitológico e na sorologia IgM anti-*T. cruzi*, estando entre esses 2 o único com positividade nesse espécime; 3 apresentaram qPCR negativa em suas amostras de sangue total, apresentando positividade no teste parasitológico e na sorologia IgM anti-*T. cruzi*; e 1 apresentou negatividade em todos os espécimes e por todas as técnicas testadas. Vale destacar que os 3 pacientes com qPCR negativas tanto nas amostras de sangue total quanto no sêmen, já estavam em média com 17,33 dias de tratamento quando tiveram amostras de sangue submetidas ao diagnóstico molecular.

Estudos vêm demonstrando a possibilidade da via sexual como mais uma dentre as formas de transmissão da DC, evidenciando a importância de sua investigação, tendo em vista a sua contribuição para a manutenção do ciclo de transmissão do parasito (MARTIN et al., 2015; RIOS et al., 2018). Em um estudo de Almeida et al. (2019), a técnica molecular foi utilizada para caracterização em animais de biotério, demonstrando sua importância e a necessidade de maiores investigações sobre essa via de infecção. Gomes et al. (2019), em um estudo de revisão, indicaram que essa via de transmissão possui importante papel na saúde pública, especialmente diante da possibilidade de transmissão vertical, bem como pela migração de indivíduos de áreas endêmicas para a DC para as áreas não endêmicas.

O tratamento, realizado no Brasil com o uso do benznidazol, oferece eficácia aproximada de 100% quando administrado no início da infecção aguda (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019), o que está de acordo com os resultados deste trabalho. A partir dos dados da evolução clínico-terapêutica dos indivíduos infectados no surto ocorrido no sertão pernambucano em que, até o momento, 3 coletas de sangue e qPCRs pós-tratamento foram realizadas, apresentando negatização de carga parasitária detectável pela técnica molecular, sendo esta a metodologia atualmente indicada para o acompanhamento da evolução terapêutica dos indivíduos submetidos ao tratamento (DIAS et al, 2016).

No entanto, há dificuldades na demonstração da eficácia do tratamento, tanto pela falta de critérios de cura confiáveis, como pela baixa sensibilidade das técnicas parasitológicas convencionais e das técnicas sorológicas, que podem apresentar resultados reagentes por um longo período após a terapia, demonstrando a importância de estudos para a validação da qPCR como ferramenta de avaliação de falha pós-tratamento, tendo em vista sua utilidade para identificação desta por meio da detecção positiva do DNA parasitário, quando na comparação da eficácia do medicamento, na sua tolerância, na organização dos esquemas terapêuticos, na determinação de um período de acompanhamento, além de sua utilização no monitoramento nos casos em que existe risco de reativação da doença (BRITTO et al., 2009; MARIN-NETO, 2010; RASSI; RASSI; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Um estudo realizado por Solari et al. (2001) avaliou 66 crianças de 0-10 anos de idade, portadoras da infecção de Chagas. Tratadas com a droga nifurtimox, elas foram monitoradas a cada 3 meses no primeiro ano de tratamento, e a cada 6 meses nos segundo e terceiro ano pós-terapia antiparasitária, sendo a avaliação realizada por meio da técnica de PCR, por técnicas sorológicas e método parasitológico indireto. A PCR foi positiva nos 66 casos pré-tratamento. A sorologia não sofreu alteração 36 meses após o tratamento em cerca de 86% dos casos. A parasitologia indireta sofreu queda entre 3-6 meses pós-tratamento. Segundo os autores, a PCR foi a metodologia de maior eficácia para o monitoramento três anos após a terapia, quando todas as crianças tratadas passaram de positivas para negativas na técnica molecular, não sendo observada significância entre a idade do paciente e o período para a negativação pela PCR. Galvão et al. (2003), afirma que não há como garantir que uma PCR negativa signifique cura parasitológica. Britto et al. (2009) apontam que uma PCR pós-tratamento que apresenta resultado negativo pode indicar a ausência do DNA parasitário naquele momento. Contudo, havendo a realização de teste sorológico e testagem molecular, em que ambos apresentam resultados negativos, há, neste caso, um provável indicativo de cura, reforçando a importância da técnica.

Diante dos fatos, mostra-se relevante o desenvolvimento do que poderíamos chamar de “padrão-ouro composto” para os casos agudos, onde os resultados dos testes parasitológicos diretos e sorologia IgM anti-*T. cruzi*, para esta fase da infecção seriam analisados juntamente aos resultados da qPCR, aumentando a confiabilidade dos resultados.

É importante destacar que a reconhecida eficácia do tratamento etiológico durante a fase aguda da infecção pode servir como um fator limitante para um diagnóstico preciso dos casos por meio da técnica molecular. Como em relação aos 28 pacientes classificados pelo critério laboratorial (SES/PE) deste surto ocorrido no estado, em que 12 destes não apresentaram resultados de qPCR concordantes com os dados dos testes parasitológicos diretos e sorologia IgM anti-*T. cruzi*. Contudo, todos estes pacientes tiveram amostras colhidas para serem submetidas à qPCR posteriormente à coleta para dos demais testes, encontrando-se entre 10 – 31 dias após o início da terapia antiparasitária. Além do viés do momento em que tais amostras foram coletadas, é importante destacar que estas foram colhidas e direcionadas à qPCR por meio dos hospitais solicitantes e que, em alguns casos, as amostras podem não ter sido armazenadas da forma correta, possibilitando a degradação do material genético nela disposto. A quantidade e a qualidade do DNA amostral são consideravelmente afetadas por diversos fatores, como coleta e transporte, bem como o período de armazenamento e temperatura ideal (ANDRIOLO et al., 2014; MELO et al., 2010).

Santana et al. (2019) relatam que, num surto de DC aguda ocorrido ao final de 2017, durante avaliação clínica dos indivíduos suspeitos amostras foram coletadas para serem submetidas a PCR, cultura e xenodiagnóstico e, posteriormente, os pacientes encaminhados ao tratamento. Britto et al. (2009) apontam que, nas populações de *T. cruzi* suscetíveis ao fármaco, a atividade de supressão parasitária inicia quase que imediatamente após o início do tratamento. Portanto, para uma maior precisão nos diagnósticos, é de extrema importância que, no momento inicial de suspeita de um caso e antes da implementação do tratamento etiológico, amostras sejam coletadas e armazenadas de maneira correta, além da necessidade de serem imediatamente direcionadas para a realização da qPCR.

Levando em consideração a fase 3 de um processo de validação de teste diagnóstico (SACKETT; HAYNES, 2002) em que a metodologia em teste é comparada a um padrão-ouro em um estudo “cego”, é possível afirmar que a qPCR aqui desenvolvida atendeu a tais exigências, pois foi capaz de distinguir os indivíduos doentes dos não doentes dentro da população de suspeitos. Se considerada a fase 4, em que se propõe determinar indicadores para classificação da qualidade de vida dos envolvidos na pesquisa, pode-se afirmar que esta fase foi atendida, em partes, pois a qPCR teve papel importante na decisão dos médicos

quanto a implementação/suspensão do tratamento etiológico, auxiliando na melhora clínica daqueles submetidos ao tratamento, bem como evitando a exposição a fármacos com certa toxicidade por aqueles sem quaisquer indícios da doença.

Para o indivíduo submetido à pesquisa, pode-se dizer que o benefício, estando neste caso relacionado a um diagnóstico rápido e sensível, capaz de auxiliar quanto a decisões médicas e terapias, foi real e o ônus de uma coleta de sangue não apresentou riscos ou consequências.

10 CONCLUSÕES

- a) O estudo demonstrou a possibilidade de utilização da qPCR como método diagnóstico para detecção do DNA de *T. cruzi* em amostras de pacientes com doença de Chagas aguda;
- b) O SAT-DNA se mostrou como o melhor alvo para a detecção parasitária nesta pesquisa e o sistema TcSAT-IAM, desenvolvido nesta pesquisa, foi considerado o melhor sistema para a detecção do DNA de *T. cruzi*;
- c) Através da análise dos dados pode-se perceber que o início de tratamento, anterior a coleta da amostra a ser direcionada a qPCR, está relacionado a remissão da carga parasitária, interferindo no resultado da qPCR;
- d) A utilização da técnica para o monitoramento de falha terapêutica, tendo seus resultados alinhados a melhora clínica dos pacientes, reforça sua importância para tal finalidade;
- e) Evidenciou-se, por fim, a importância desta técnica para um diagnóstico rápido e preciso, além de reforçar que pesquisas como esta se mostram necessárias para o aprimoramento da técnica.

11 CONSIDERAÇÕES

Diante dos dados apresentados, é recomendado:

- a) O desenvolvimento de um padrão-ouro composto, em que os resultados da qPCR sejam considerados junto aos dos demais testes parasitológicos diretos e sorologia IgM anti-*T. cruzi* para o diagnóstico dos casos;
- b) Coletar imediatamente a amostra a ser direcionada a qPCR, para os casos de suspeita de infecção pelo *T. cruzi*, além de atenção ao período de armazenamento, acondicionamento e transporte da amostra coletada;
- c) A coleta deve ser realizada antes ou até dois dias após o início da terapia antiparasitária.

REFERÊNCIAS

ABRAS, A. *et al.* Introducing automation to the molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: A comparative study of sample treatments, DNA extraction methods and real-time PCR assays. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 4, p. e0195738, 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0195738>. Acesso em: 20 set. 2019.

ALMEIDA, A. B. *et al.* Sexual Transmission of American Trypanosomes from Males and Females to Naive Mates. **Journal of Visualized Experiments**, Princeton, v. 143, p. e57985, 2019.

ANONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 429-432, 1999.

AYRES, M. *et al.* **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas biológicas e médicas. Belém: MCT, IDSM: CNPq, 2007.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Ministério da Saúde, v. 50, n. 2, 2019.

BRASIL. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. SAÚDE, O. P. A. D. Rio de Janeiro. PANAFTOSAVP/OPAS/OMS, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica**. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 21 nov. 2019.

BRASIL. **Portaria nº 57, de 30 de outubro de 2018**. Torna pública a decisão de aprovar o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da doença de Chagas, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS. Brasília: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, 2018. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Protocolos/PCDT_Doenca_de_chagas.pdf. Acesso em: 20 nov. 2019.

BRASIL. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Diretrizes metodológicas**: diretriz de avaliação econômica. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**: guia de bolso. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, DF: Ministério da Saúde. cad. 11, v. 7, p.64, 2009.

- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. Informe Técnico. Brasília, DF: Ministério da Saúde. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 4, p. 475-478, 2013.
- BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (org.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.
- CANÇADO, J. R.; CHUSTER, M. Tratamento específico. In: *Cardiopatia Chagásica*. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, p. 327-355, 1985.
- CARDOSO, D. R. F. *et al.* Chagasic infection among blood donors in Brazil: an integrative review. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 283–291, 2018.
- CLARK, C.; O. PUNG. Host specificity of ribosomal DNA variants in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 66, p.175-179, 1994.
- CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Suplemento III. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, p. 7-29, 2005.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 104, 2009.
- D'ÁVILA, D. A. *et al.* Monitoring the parasite load in chronic Chagas disease patients: comparison between blood culture and quantitative real time PCR. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 11, p. e0208133, 2018.
- DIAS J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. (org.). **Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 5, p. 48-74, 2000.
- DIAS, J. C. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas - 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, p. 7-86, 2016.
- DOCAMPO, R. *et al.* Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2005.
- DRUGS FOR NGLLECTED DISEASES INITIATIVE. **Doença de Chagas**. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>. Acesso em: 05 dez. 2018.
- DUFFY, T. *et al.* Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 3, n. 4, p. e419, 2009.

- FARAL-TELLO, P. *et al.* Imidazolium compounds are active against all stages of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 43, p. 262–268, 2014.
- FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial**: avaliação de métodos de diagnósticos das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2 Ed., 2001.
- FERREIRA, A. W.; MORAES, S. L. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**: correlações clínico-laboratoriais. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- FICA, A. *et al.* Enfermedad de Chagas del sistema nervioso central en un paciente con SIDA demostrada por métodos cuantitativos moleculares. **Revista Chilena de Infectología**, Santiago, v. 34, n. 1, p. 69-76, 2017.
- FINSTERER, J.; AUER, H. Parasitoses of the human central nervous system. **Journal of Helminthology**, London, v. 87, p. 257–270, 2013.
- Freitas, J. M. *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 2, n. 3, 2006.
- GALVÃO, L. M. C. *et al.* PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 41, p. 5066-5070, 2003.
- GONÇALVES, S. C. *et al.* Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of Leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, São Paulo, v. 8, p. 188-197, 2012.
- JUSTI, S. A.; GALVÃO, C. A origem evolucionária da diversidade nos vetores da doença de Chagas. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 33, p 42 - 52, 2017.
- KIRCHHOFF, L. V. *et al.* Comparison of PCR and Microscopic Methods for Detecting *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 5, p. 1171–1175, 1996. DOI: 0095-1137/96/\$04.0010.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 33, n. 7, p.1870–1874, 2016.
- LEE, B. Y. *et al.* Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet infectious diseases**, London, v. 13, n. 4, p. 342-348, 2013.
- LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In Z Brener, Z Andrade, M Barral-Netto (org.). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 344-348, 2000.

MACHADO, C. Metabolismo de DNA em *Trypanosoma cruzi*: o que sabemos dos 3 Rs (replicação, reparo e recombinação)? *Biologia Molecular*. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/biologia-molecular> Acessado em: 29 nov. 2019.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.43, n.5, 2010.

MATTOS, E. C. *et al.* Molecular detection of *Trypanosoma cruzi* in acai pulp and sugarcane juice. **Acta Tropica**, Basel, v. 176, p.311-315, 2017.

MAYTA, H. *et al.* Improved DNA extraction technique from clot for the diagnosis of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, 2019.

MELO, M. F. *et al.* Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 154, 2015.

MELO, M. R. *et al.* Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 375-381, 2010.

MESSENGER, L. A.; BERN, C. Congenital Chagas disease: current diagnostics, limitations and future perspectives. **Current Opinion Infectious Diseases**, Londres, v. 31, p. 415–421, 2018.

MILES, M. A. *et al.* Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, Londres, v. 272, n. 5656, p. 819-21, 1978.

MILES, M. A. *et al.* The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Londres, v.71, n.3, p.217-25, 1977.

MOREIRA, O. C. *et al.* Development of conventional and real-time multiplex PCR-based assays for estimation of natural infection rates and *Trypanosoma cruzi* load in triatomine vectors. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 10, n. 404, 2017.

MOREIRA, O. C. *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 Tropica**, Basel, v. 25, p.23–31, 2013.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, London, v. 10, n. 3, p. 465-481, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Doença de Chagas**. Disponível em [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-)

trypanosomiasis). Acesso em: 1 out. 2018.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Enfermedad de Chagas en las Américas**: una revisión de la situación actual de salud pública y su visión para el futuro. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14399:enfermedad-de-chagas-en-las-americas-una-revision-de-la-situacion-actual-de-salud-publica-y-su-vision-para-el-futuro&Itemid=72315&lang=en. Acesso em: 30 out. 2018.

PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* in canine blood. **The Veterinary Journal**, Bellevue, v. 182 (2), p. 356-358, 2009.

PARRADO, R. *et al.* Real-Time PCR for the evaluation of treatment response in clinical trials of adult chronic Chagas disease: usefulness of serial blood sampling and qPCR replicates. **American Society for Microbiology Journals**, Washington, 2018.

PÉREZ-MOLINA, J.; MOLINA, J. A. Chagas disease. **Lancet**, Minneapolis, v. 391, p. 82–94, 2018.

PINAZO, M.J.; GASCON, J. Chagas disease: from Latin America to the world. **Gastroenterología y Hepatología**, Barcelona, v. 33, n. 3, p. 191-200, 2015.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 107-15 107, 2003.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, Minneapolis, v. 375, p. 1388–402, 2010.

RUSSOMANDO, G. *et al.* Polymerase Chain Reaction-Based Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Serum. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, n.11, p.864-2868, 1992.

RUSSOMANDO, G. *et al.* Treatment of congenital Chagas disease diagnosed and followed up by the Polymerase Chain Reaction. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Illinois, v. 59 (3), p. 487–491, 1998.

SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. The architecture of diagnostic research. **British Medical Journal**, Londres, v. 2; n. 324 (7336), p. 539-41, 2002.

SANTANA, M. P.; SOUZA-SANTOS, R.; ALMEIDA, A. S. Prevalência da doença de Chagas entre doadores de sangue do Estado do Piauí, Brasil, no período de 2004 a 2013. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 2, p. e00123716, 2018.

SANTANA, R. A. G. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 25, n. 1, 2019.

SANTOS, F. R. *et al.* Systematic neonatal screening for congenital Chagas disease in Northeast Brazil: prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in the Southern region of Sergipe. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 51, n. 3, p. 310-317, 2018.

SCHIJMAN, A. G. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, Basel, v. 184, p. 59–66, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica** Barueri: Manole, 2014. v. 47.

SOLARI, A. *et al.* Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London. v. 48, p. 515-519, 2001.

SOUZA, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 17-36, 1999.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 7, n.317, 2014.

TEIXEIRA, E. D *et al.* **Atlas didático: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***. 1. ed. Rio de Janeiro: Fundação CIERJ: Consórcio CEDERJ, 2011.

TOO, H. P. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v.114, p.146-154, 2003.

VELASCO, A.; MORILLO, C. A. Chagas heart disease: A contemporary review. **Journal of Nuclear Cardiology**, St Louis, v. 1, p. 1-7, 2018.

VELOSO, V. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 6, p. 528-534, 2008.

VIRREIRA, M. *et al.* Comparison of Polymerase Chain Reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Illinois, v. 68, n.5, p. 574–582, 2003.

VOLPATO, F. C. Z. *et al.* Combined parasitological and molecular-based diagnostic tools improve the detection of *Trypanosoma cruzi* in single peripheral blood samples from patients with Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 50, n.4, p. 506–515, 2017.

VOLTA, B. J. *et al.* Some limitations for early diagnosis of congenital Chagas infection by PCR. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 141, n. 5, p. e20163719, 2018.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 4, n. 6, p. 337-348, 2004.

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

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, Basel, v. 187, p. 38-52, 2018.

ZINGALES, B.; *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 12, p. 240-253, 2012.

APÊNDICE A – LAUDO DE PESQUISA



Ministério da Saúde

 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

SERVIÇO DE REFERÊNCIA EM DOENÇA DE CHAGAS LAUDO DE PESQUISA – PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Nome do paciente: XXXXXXXXXXXXXXXXX

Registro SRDC: 58/2019

Prontuário / Procedência: XXXXXXXXXXXXX

Médico solicitante: XXXXXXXXXXXXXXXXX

CRM: XXXX

Recebimento da amostra: 04.06.2019

Liberação do laudo: 07.06.2019

Tipo de amostra: Sangue

Resultado:

- Positivo para detecção de DNA do *Trypanosoma cruzi*
 Negativo para detecção de DNA do *Trypanosoma cruzi*
 Inconclusivo para detecção de DNA do *Trypanosoma cruzi*

Gráfico 1. Curva de amplificação para o sistema TcSAT
 Carga parasitária: ~ 3.381,64
 Data de processamento: 05/06/2019

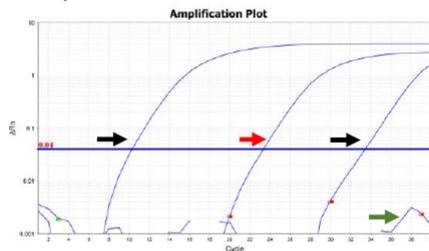
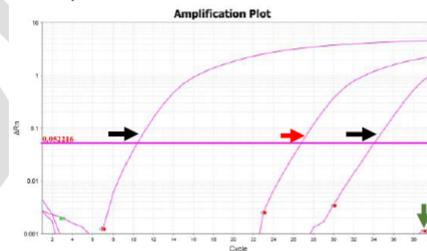


Gráfico 2. Curva de amplificação para o sistema Cruz
 Carga parasitária: ~ 2.508,56
 Data de processamento: 05/06/2019



Legenda: Setas pretas: controles positivos forte e fraco. Seta vermelha: amostra do paciente. Seta verde: controle negativo da reação.

INTERPRETAÇÃO: A partir da análise da carga parasitária e da Curva de amplificação presentes nos gráficos 1 e 2, referentes a dois alvos de DNA satélite de *T. cruzi*, foi confirmada a presença de DNA do agente etiológico da doença de Chagas no espécime clínico avaliado. Deve-se levar em consideração que um parasito apresenta aproximadamente 300 fg de DNA. Recomenda-se que a condução da terapia seja também relacionada aos aspectos clínicos e epidemiológicos do paciente. A decisão pela implementação do tratamento é um critério médico.

Recife, 07 de junho de 2019.

Milena de Paiva Cavalcanti

Milena de Paiva Cavalcanti, Ph. D.
 Tecnologista em Saúde Pública
 SIAPE 015549674
 CRMV-PE 2777

Virginia M. Barros de Lorena

Virginia Maria Barros de Lorena, Ph.D.
 Pesquisadora em Saúde Pública
 SIAPE 1984445
 CRBM-PE 1930

**APENDICE B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
(INSTITUIÇÃO AGGEU MAGALHÃES)**



Título do Projeto: "DESENVOLVIMENTO DE UM DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA A DOENÇA DE CHAGAS".

Pesquisador responsável: Virginia Maria Barros de Lorena
Instituição onde será realizado o projeto: IAM/Fiocruz

Data de apreciação ao CEP: 22 de Março de 2019

Registro no CAAE: 07178819.8.0000.5190

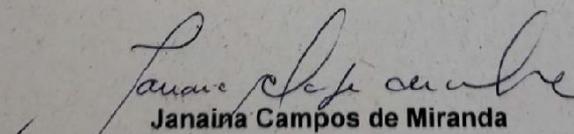
Número do Parecer na Plataforma Brasil: 3.215.757

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O CEP/CPqAM reforça a necessidade de entrega de relatórios parcial e final, em cumprimento à Resolução CNS 466/12, capítulo XI, artigo 2d.

Recife, 17 de abril de 2019


Janaina Campos de Miranda
 Coordenadora do CEP/CPqAM/Fiocruz

Janaina Campos de Miranda
 Pesquisadora em Saúde Pública
 Coordenadora
 Mat. SIAPE 464777
 CEP/CPqAM/FIOCRUZ

APENDICE C – INSTRUÇÕES PARA COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS A SEREM DIRECIONADAS À PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL



INSTRUÇÕES PARA A COLETA E O ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS A SEREM DIRECIONADAS À PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

O Serviço de Referência em Doença de Chagas do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco (SRDC – IAM/FIOCRUZ-PE), vem por meio deste documento recomendar procedimentos para coleta e armazenamento de amostras biológicas a serem direcionadas à PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Destacando que sempre devem ser levadas em consideração as recomendações sobre biossegurança padronizados pela legislação.

Antes da coleta do material biológico a ser direcionado à qPCR, faz-se necessário:

- Anotar data e hora da realização da coleta;
- Executar a antissepsia recomendada para o tipo de coleta a ser realizada;
- Atentar ao tubo adequado para cada tipo de amostra biológica / exame a ser realizado;
- Atentar ao armazenamento e transporte do material coletado.

No quadro a seguir, são descritas as recomendações básicas para coleta, armazenamento e transporte das amostras biológicas a serem coletadas e direcionadas à qPCR.

TIPO DE MATERIAL	PROCEDIMENTO DE COLETA	ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO	ACONDICIONAMENTO E TRANSPORTE
Sangue total	Coletar de 2 a 4ml de sangue, em tubo contendo EDTA, imediatamente após início dos sintomas/suspeita.	Conservar em geladeira 2°C a 8°C (para envio no mesmo dia) ou freezer a -20°C (por até 3 dias) até o envio para o laboratório. Envio (preferencialmente) imediato.	Acondicionar em caixa de transporte de amostra biológica, com baterias de gelo/gelo seco.
Soro	Coletar de 2 a 4ml de sangue, em tubo contendo solução coagulante, imediatamente após início dos sintomas/suspeita.	Conservar em geladeira 2°C a 8°C (para envio no mesmo dia) ou freezer a -20°C (por até 3 dias) até o envio para o laboratório. Envio (preferencialmente) imediato.	Acondicionar em caixa de transporte de amostra biológica, com baterias de gelo/gelo seco.
LCR	Coletar cerca de 4ml, imediatamente após início dos sintomas/suspeita.	Conservar em geladeira 2°C a 8°C (para envio no mesmo dia) ou freezer a -20°C (por até 3 dias) até o envio para o laboratório. Envio (preferencialmente) imediato.	Acondicionar em caixa de transporte de amostra biológica, com baterias de gelo/gelo seco.

APENDICE C – INSTRUÇÕES PARA COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS A SEREM DIRECIONADAS À PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL



Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Aggeu Magalhães



FIOCRUZ
 PERNAMBUCO



SRDC
 Serviço de Referência em
 Doença de Chagas

Sêmen	Coletar imediatamente após início dos sintomas/suspeita.	Conservar em geladeira 2°C a 8°C (para envio no mesmo dia) ou freezer a -20°C (por até 3 dias) até o envio para o laboratório. Envio (preferencialmente) imediato.	Acondicionar em caixa de transporte de amostra biológica, com baterias de gelo/gelo seco.
Tecidos	Coletar 1 a 2 g de tecidos, imediatamente após início dos sintomas/suspeita.	Conservar em geladeira 2°C a 8°C (para envio no mesmo dia) ou freezer a -20°C (por até 3 dias) até o envio para o laboratório. Envio (preferencialmente) imediato.	Acondicionar em caixa de transporte de amostra biológica, com baterias de gelo/gelo seco.

REFERÊNCIAS:

ANDRIOLO, A. et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica. *Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial*. Manole: Minha Editora, Barueri. v. 47, 2014.

MELO, M. R. et al. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial*. v. 46, n. 5, p. 375-381, 2010.

Organização:

Serviço de Referência em Doença de Chagas
 Instituto Aggeu Magalhães-Fundação Oswaldo Cruz
 Contato: (81) 2101-2586 (Laboratório)

Virginia M. Barros de Lorena

Virginia Maria Barros de Lorena, Ph.D.
 Pesquisadora em Saúde Pública
 Coordenadora do Serviço de Referência em Doença de Chagas
 SIAPE 1984445
 CRBM-PE 1930

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.870-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600
 Fax: (81) 3453-1911 www.cpgam.fiocruz.br