

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES**  
**Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde**

**SARAH DE SOUZA LACERDA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BASEADOS EM AMPLIFICAÇÃO  
ISOTÉRMICA EM ALÇA (LAMP) PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE  
CHAGAS**

**Recife**  
**2021**

**SARAH DE SOUZA LACERDA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BASEADOS EM AMPLIFICAÇÃO  
ISOTÉRMICA EM ALÇA (LAMP) PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE  
CHAGAS**

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.

**Orientador:** Dr. Fábio Lopes de Melo

**Coorientador:** Dr. Bruno de Melo Carvalho

Recife

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães**

L131d	<p>Lacerda, Sarah de Souza.</p> <p>Desenvolvimento de sistemas baseados em amplificação isotérmica em alça (LAMP) para o diagnóstico da doença de Chagas / Sarah de Souza Lacerda. - Recife: [s.n.], 2021.</p> <p>84 p.: il., tab.; 30 cm.</p> <p>Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.</p> <p>Orientador: Fábio Lopes de Melo; coorientador: Bruno de Melo Carvalho.</p> <p>1. Doença de Chagas - diagnóstico. 2. Diagnóstico molecular. 3. Técnica de Amplificação de Ácidos Nucleicos. 4. Reação em Cadeia da Polimerase - métodos. 5. Sensibilidade e especificidade. I. Melo, Fábio Lopes de Melo. II. Carvalho, Bruno de Melo. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 614.39</p>
-------	---

**SARAH DE SOUZA LACERDA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BASEADOS EM AMPLIFICAÇÃO  
ISOTÉRMICA EM ALÇA (LAMP) PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE  
CHAGAS**

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.

Data da aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dr. Fábio Lopes de Melo (Orientador)**

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

**Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos**

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

**Dr. Rosana de Albuquerque Montenegro**

Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

Aos meus pais Adilson e Simone.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e sabedoria para superar todos os desafios durante essa trajetória.

Aos meus pais pelo amor, apoio e incentivo. Por sempre estarem presente nos momentos mais difíceis, com uma palavra ou gesto de carinho.

Ao meu noivo por ser um companheiro sempre presente, por viver todas as experiências comigo desde o ensino médio até o mestrado, me incentivando e me ajudando a conquistar meus objetivos.

Aos meus irmãos, avós e familiares que sempre torceram pelo meu sucesso.

Ao meu orientador Dr. Fábio por acreditar no meu potencial me dando a oportunidade de iniciar na área de pesquisa. Agradeço por todo carinho e ensinamento durante todos esses anos, que contribuíram imensamente para o meu crescimento pessoal e profissional. E ao meu coorientador por acreditar no meu trabalho.

À Dr. Virgínia e à Cíntia por tornarem este trabalho possível, cedendo as amostras e ajudando durante todo o desenvolvimento do projeto.

Aos meus colegas de laboratório pela troca de experiências e pelo apoio, em especial, à Rhaíssa, Keylla, Ana Emília, Beatriz, Alejandra e Yuri.

Aos funcionários do Aggeu, em especial, à Cleide e Dona Fátima por sempre me acolherem com um sorriso.

Ao Instituto Aggeu Magalhães pela estrutura disponibilizada e ao órgão de fomento CAPES pelo financiamento à pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para tornar este trabalho possível.

LACERDA, Sarah de Souza. **Desenvolvimento de sistemas baseados em amplificação isotérmica em alça (LAMP) para o diagnóstico da doença de Chagas**. 2021. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

## RESUMO

A doença de Chagas representa um importante problema de saúde pública, principalmente na América Latina. O diagnóstico precoce durante a fase aguda é crucial, pois permite o tratamento imediato, podendo interferir no prognóstico. A técnica de amplificação isotérmica em alça (LAMP) vem demonstrando potencial, por ser sensível, específica, de fácil execução e baixo custo. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver sistemas baseados em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas. Inicialmente foram avaliados dois sistemas descritos na literatura: Thekiso *et al.* e Ordóñez *et al.* O sistema de Ordóñez *et al.* demonstrou elevada sensibilidade e especificidade, sendo utilizado como sistema de LAMP convencional e para o desenvolvimento de um sistema de LAMP em tempo real. O sistema de LAMP convencional foi aplicado em amostras de 77 indivíduos expostos ao surto agudo ocorrido em Ibimirim/PE e comparado ao diagnóstico parasitológico, sorológico e ao sistema de qPCR (TcSAT-IAM). Segundo critérios da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, 28 casos foram confirmados pelo critério laboratorial e 10 pelo clínico-epidemiológico. Considerando o critério laboratorial, a sensibilidade e especificidade do sistema de LAMP foi de 39,29% e 83,67%, respectivamente. Considerando o diagnóstico pelo sistema TcSAT-IAM, o sistema de LAMP apresentou sensibilidade de 60,87%, especificidade de 90,74%, acurácia de 81,82% e concordância considerada moderada. A coleta das amostras após o início do tratamento e o tempo de armazenamento representaram importantes limitações do estudo. Estes resultados demonstram a importância da coleta e armazenamento adequados das amostras e sugerem um “padrão-ouro composto”, considerando os testes preconizados em conjunto com técnicas moleculares, sendo a técnica de LAMP mais acessível para áreas de recursos limitados. Para facilitar a implementação na rotina laboratorial, foi desenvolvido um kit baseado em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas aguda.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas; Diagnóstico; Técnica de Amplificação de Ácidos Nucleicos.

LACERDA, Sarah de Souza. **Development of systems based on Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) for diagnosis of Chagas disease**. 2021. Dissertation (Academic Master's in Bioscience and Biotechnology at Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

## ABSTRACT

Chagas disease represents an important public health problem, especially in Latin America. Early diagnosis during the acute phase is crucial, as it allows for immediate treatment and may interfere with the prognosis. The Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) has shown potential, as it is sensitive, specific, easy to perform and low cost. The objective of the present work was to develop LAMP-based systems for the diagnosis of Chagas disease. Initially, two systems described in the literature were evaluated: Thekiso *et al.* and Ordóñez *et al.* The system by Ordóñez *et al.* showed high sensitivity and specificity, being used as a conventional LAMP system and for the development of a real-time LAMP system. The conventional LAMP system was applied to samples from 77 individuals exposed to the acute outbreak that occurred in Ibimirim/PE and compared to the parasitological and serological diagnosis and to the qPCR system (TcSAT-IAM). According to criteria of the Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, 28 cases were confirmed by laboratory criteria and 10 by clinical-epidemiological criteria. Considering the laboratory criteria, the sensitivity and specificity of the LAMP system was 39.29% and 83.67%, respectively. Considering the diagnosis by the TcSAT-IAM system, the LAMP system had a sensitivity of 60.87%, specificity of 90.74%, accuracy of 81.82% and agreement considered moderate. The collection of samples after the beginning of the treatment and the storage time represented important limitations of the study. These results demonstrate the importance of proper collection and storage of samples and suggest a “compound gold standard”, considering the tests recommended in conjunction with molecular techniques, being the LAMP technique more accessible for areas with limited resources. To facilitate implementation in laboratory routine, a LAMP-based kit for the diagnosis of acute Chagas disease was developed.

**Keywords:** Chagas disease; Diagnosis; Nucleic Acid Amplification Techniques.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Distribuição global dos casos de doença de Chagas, com base em estimativas oficiais, 2018 .....	16
Figura 2 -	Desenho esquemático do ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
Figura 3 -	Esquema representativo dos primers de LAMP .....	31
Figura 4 -	Representação esquemática da etapa não-cíclica de LAMP .....	32
Figura 5 -	Representação esquemática da etapa cíclica de LAMP .....	33
Quadro 1 -	Publicações relatando a utilização da técnica da LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas .....	35
Figura 6 -	Esquema de preparação da curva de diluição seriada de fator 10 de DNA de <i>T. cruzi</i> .....	45
Quadro 2 -	Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de LAMP .....	46
Figura 7 -	Formas utilizadas para visualização dos resultados da reação de LAMP .....	48
Figura 8 -	Desenho esquemático do kit protótipo de LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas .....	50
Quadro 3 -	Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença .....	51
Figura 9 -	PCR convencional utilizando os primers externos de Thekisoe <i>et al.</i> (2010) .....	53
Figura 10 -	Resultado da reação de LAMP utilizando os primers de Ordóñez <i>et al.</i> (2020) .....	54
Figura 11 -	Resultado do teste de sensibilidade analítica do sistema de LAMP convencional .....	55
Figura 12 -	Resultado do teste de especificidade analítica do sistema de LAMP convencional .....	56
Figura 13 -	Resultado do LAMP em tempo real utilizando a curva de diluição seriada de DNA de <i>T. cruzi</i> .....	57
Figura 14 -	Resultado do LAMP convencional nas amostras dos indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas .....	58
Figura 15 -	Resultado do primeiro teste de desenvolvimento do kit baseado em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas .....	65
Figura 16 -	Resultado do segundo teste de desenvolvimento do kit baseado em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas .....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise comparativa entre os resultados do sistema de LAMP e os critérios diagnósticos considerados pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco para definição dos casos .....	59
Tabela 2 -	Análise comparativa entre os resultados do sistema de LAMP e os casos definidos pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco pelo critério laboratorial	60
Tabela 3 -	Pacientes considerados casos pela SES/PE de acordo com critério laboratorial tratados até 3 dias .....	60
Tabela 4 -	Análise comparativa entre os resultados do sistema de LAMP e o diagnóstico parasitológico para a doença de Chagas .....	62
Tabela 5 -	Análise comparativa entre os resultados do sistema de LAMP e o diagnóstico sorológico para a doença de Chagas .....	62
Tabela 6 -	Análise comparativa entre os resultados do sistema de LAMP e o sistema de qPCR (TcSAT-IAM) para o diagnóstico da doença de Chagas .....	63
Tabela 7 -	Análise comparativa dos custos por reação de LAMP em relação a qPCR .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIP	<i>Backward Inner Primer</i>
BLP	<i>Backward Loop Primer</i>
Bst	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTUs	<i>Discrete Typing Units</i>
fg	Fentograma
FIP	<i>Foward Inner Primer</i>
FLP	<i>Forward Loop Primer</i>
HNB	Hydroxy Naphtol Blue
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
kDNA	<i>kinetoplast DNA</i>
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
µL	Microlitro
min	Minutos
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de bases
pg	Picograma
pmol	Picomol
qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real
satDNA	<i>Satellite DNA</i>
SES/PE	Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
2.1 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas .....	15
2.2 Agente etiológico – <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
2.3 Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> .....	19
2.4 Fases clínicas da doença .....	22
2.5 Tratamento.....	23
2.6 Diagnóstico laboratorial.....	23
2.6.1 Diagnóstico parasitológico .....	24
2.6.2 Diagnóstico sorológico .....	25
2.6.3 Diagnóstico molecular.....	27
2.7 Amplificação isotérmica em alça (LAMP) .....	29
2.7.1 Princípios básicos da técnica .....	29
2.7.2 Etapas de reação de LAMP .....	31
2.7.3 Formas de visualização do resultado .....	33
2.7.4 Aplicação da técnica de LAMP na detecção do DNA de <i>T. cruzi</i> .....	35
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>39</b>
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	<b>40</b>
<b>5 HIPÓTESE</b> .....	<b>41</b>
<b>6 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>42</b>
6.1 Objetivos específicos.....	42
<b>7 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
7.1 Desenho de estudo.....	43
7.2 Amostras de estudo.....	43
7.3 Extração e purificação de DNA das amostras biológicas.....	43
7.4 Diagnóstico etiológico das amostras biológicas.....	44
7.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	44
7.6 Extração e purificação de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> .....	44
7.7 Curva de diluição seriada de DNA de <i>T. cruzi</i> .....	45
7.8 Amplificação isotérmica em alça (LAMP) .....	46
7.8.1 Otimização do sistema de LAMP convencional.....	46
7.8.2 Análise e registro dos resultados de LAMP .....	47
7.8.3 Otimização do sistema de LAMP em tempo real .....	48

7.8.4 Avaliação da sensibilidade e especificidade analítica dos sistemas de LAMP .....	49
7.8.5 Aplicação do sistema de LAMP convencional nas amostras de indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas em Ibimirim/PE.....	49
7.8.6 Análise comparativa dos custos das técnicas de LAMP convencional e qPCR.....	49
7.8.7 Desenvolvimento de um kit diagnóstico baseado em LAMP.....	50
<b>7.9 Análise estatística.....</b>	<b>51</b>
<b>7.10 Considerações éticas.....</b>	<b>52</b>
<b>8 RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>8.1 Otimização do sistema de LAMP convencional para o diagnóstico da doença de Chagas .....</b>	<b>53</b>
<b>8.2 Sensibilidade analítica do sistema de LAMP convencional.....</b>	<b>54</b>
<b>8.3 Especificidade analítica do sistema de LAMP convencional.....</b>	<b>55</b>
<b>8.4 Otimização do sistema de LAMP em tempo real para o diagnóstico da doença de Chagas .....</b>	<b>56</b>
<b>8.5 Aplicação do sistema de LAMP convencional nas amostras de indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas em Ibimirim/PE .....</b>	<b>57</b>
<b>8.6 Análise comparativa entre os resultados obtidos pelo sistema de LAMP e os critérios estabelecidos pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco para diagnóstico dos casos .....</b>	<b>59</b>
<b>8.7 Análise comparativa entre o sistema de LAMP e o diagnóstico padrão ouro para a doença de Chagas .....</b>	<b>61</b>
<b>8.8 Análise comparativa entre o sistema de LAMP e o sistema de qPCR (TcSAT-IAM) para o diagnóstico da doença de Chagas.....</b>	<b>63</b>
<b>8.9 Análise comparativa dos custos das técnicas de LAMP e qPCR. ....</b>	<b>63</b>
<b>8.10 Desenvolvimento de um kit baseado em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas .....</b>	<b>64</b>
<b>9 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>10 CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO A – PARECER DO CEP .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada que afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo mundo, sendo endêmica em 21 países da América Latina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que pode ser transmitido por via vetorial, transfusão sanguínea, via oral, transplante de órgãos, transmissão vertical ou por acidentes de laboratório (BERN, 2015; RASSI Jr; RASSI; REZENDE; 2012). No Brasil estima-se que cerca de 2 a 3 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* e atualmente a maioria dos casos no país ocorre por transmissão oral (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015; CORASSA *et al.*, 2017; MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

A doença apresenta duas fases clínicas sucessivas: aguda e crônica. Na fase aguda, a maioria dos indivíduos são assintomáticos e alguns podem manifestar sintomas inespecíficos como febre, mal-estar, aumento do fígado, baço e linfonodos e edema subcutâneo (RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010; RASSI Jr; RASSI; REZENDE, 2012). Na fase crônica, a maioria dos indivíduos apresentam-se numa fase clínica assintomática definida como forma indeterminada e cerca de 30% desenvolvem a forma clínica sintomática, caracterizada pelo desenvolvimento de lesões cardíacas e/ou digestivas (BARRET *et al.*, 2003; RASSI Jr; RASSI; REZENDE, 2012).

Durante a fase aguda, o tratamento através da utilização do benzonidazol ou do nifurtimox, apresenta uma boa eficácia, com supressão da parasitemia e taxa de cura em torno de 80% (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Na fase crônica há controvérsias a respeito da eficiência do tratamento, principalmente nos estágios avançados com elevado comprometimento cardíaco e/ou digestivo (MUÑOZ; MURCIA; SEGOVIA, 2011; PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2009).

O diagnóstico da doença de Chagas é definido de acordo com a fase clínica em que o indivíduo se encontra (BRASIL, 2017; DIAS *et al.*, 2016). Na fase aguda, devido a elevada parasitemia, podem ser utilizadas técnicas parasitológicas convencionais, como a pesquisa a sangue fresco, esfregaço sanguíneo, gota espessa ou métodos de concentração (DIAS *et al.*, 2016). Contudo, essas técnicas apresentam como principal limitação a sensibilidade dependente da carga parasitária do hospedeiro e da habilidade do operador, sendo necessário um microscopista bem treinado. Além disso, algumas técnicas são laboriosas e apresentam tempo prolongado para liberação do resultado (LINDER *et al.*, 2008; PORRÁS *et al.*, 2015).

Na fase crônica, devido a parasitemia subpatente, não é recomendada a utilização de técnicas parasitológicas, sendo necessário o uso de dois métodos sorológicos com princípios distintos ou com diferentes preparações antigênicas, tais como ELISA, imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta (DIAS *et al.*, 2016). Apesar do diagnóstico sorológico ser considerado padrão ouro nesta fase, uma das principais limitações é o risco de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos presentes em áreas endêmicas, como *Leishmania* sp. e *Trypanosoma rangeli* (CABALLERO *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2015). Além disso, a permanência da positividade por anos mesmo após o tratamento específico, limita sua utilização na avaliação da eficácia terapêutica (GALVÃO *et al.*, 1993).

Métodos moleculares baseados na detecção do DNA de *T. cruzi*, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e sua variante PCR quantitativa em tempo real (qPCR) vêm demonstrando potencial, principalmente para o monitoramento da carga parasitária na fase crônica, na detecção precoce da infecção congênita e no acompanhamento da resposta ao tratamento (ALONSO-PADILLA, 2017; SCHIJMAN *et al.*, 2011). Entretanto, a necessidade de laboratórios bem equipados, o alto custo de execução e métodos elaborados para detecção dos produtos de amplificação, tornam essas técnicas muitas vezes inviáveis para implementação na rotina laboratorial, principalmente em países em desenvolvimento (JAMES; MACDONALD, 2015).

Desta forma, a técnica molecular de amplificação isotérmica em alça (*Loop-mediated isothermal amplification*) descrita por Notomi *et al.* (2000) vêm sendo demonstrada como uma possível ferramenta para o diagnóstico e vigilância de doenças infecciosas com elevada especificidade, rapidez e custo-benefício (MORI; NOTOMI, 2009, 2020). A técnica se baseia na amplificação de um fragmento específico da molécula de DNA, em condições isotérmicas, utilizando quatro a seis *primers* distintos, sendo dois *primers* internos (FIP e BIP), dois *primers* externos (F3 e B3) e dois *primers* do loop (FLP e BLP) (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI *et al.*, 2000). As reações da LAMP ocorrem em duas etapas sucessivas, etapa não-cíclica e etapa cíclica (PARIDA *et al.*, 2008) e ao final da reação o produto gerado pode ser visualizado a olho nu através da utilização de corantes fluorescentes (LIU *et al.*, 2017).

Devido às suas vantagens, propomos desenvolver sistemas baseados em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas e aplicar em amostras de indivíduos expostos ao surto agudo ocorrido em Ibimirim/PE.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção foram abordados os principais tópicos referentes a doença de Chagas, como: aspectos epidemiológicos, agente etiológico, ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*, fases clínicas da doença, tratamento e diagnóstico laboratorial. Além disso, foram descritos os princípios básicos, etapas de reação, formas de visualização do resultado e aplicação da técnica de amplificação isotérmica em alça (LAMP) na detecção do DNA de *T. cruzi*.

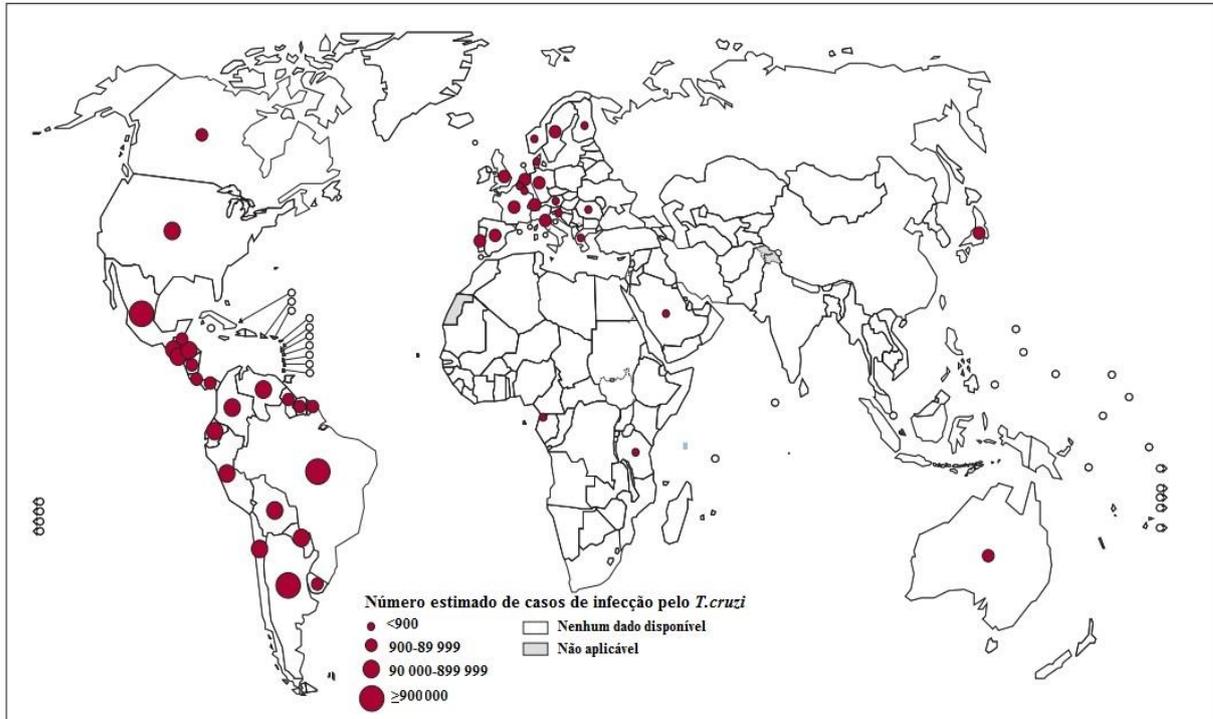
### 2.1 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É denominada como Doença Tropical Negligenciada, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), constituindo um importante problema de saúde pública (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

Estima-se que aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde é endêmica em 21 países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019).

Apesar da doença de Chagas ter maior predomínio na América Latina, devido à processos de migração populacional, há uma estimativa de aproximadamente 240.000 a 350.000 pessoas infectadas nos Estados Unidos (BERN *et al.*, 2019), além de apresentar expansão para países europeus, com prevalência em torno de 4,2% em imigrantes latino-americanos (REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2015) (Figura 1).

**Figura 1** – Distribuição global dos casos de doença de Chagas, com base em estimativas oficiais, 2018



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2020).

Na América Latina, a doença de Chagas é considerada uma doença infecciosa com grande impacto para a saúde pública, com cerca de 65 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de infecção e apresentando uma incidência anual de 28.000 casos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019). O Brasil, o México, a Argentina e a Bolívia são os países que possuem a maior prevalência de pessoas infectadas, representando aproximadamente 71% dos casos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

No Brasil, estima-se que cerca de 2 a 3 milhões de pessoas estejam infectadas e aproximadamente 600.000 apresentem complicações cardíacas e digestivas da forma crônica da doença (CORASSA *et al.*, 2017; MARTINS-MELO *et al.*, 2014). A maioria dos casos é relatada na região Norte, sendo o estado do Pará responsável por mais de 85% dos casos (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019).

Em relação às principais formas de transmissão registradas no Brasil, entre os anos de 2007 e 2016, foram relatados 69% dos casos por transmissão oral, 9% por transmissão vetorial e em 21% por formas não identificadas (BRASIL, 2019).

A doença de Chagas é classicamente transmitida para humanos por via vetorial, através de fezes de triatomíneos contaminadas com formas infectantes do *T. cruzi* inoculadas no local da picada ou através da mucosa. Contudo, também pode ser transmitida por via oral, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes de laboratório ou através da infecção congênita (BERN, 2015; RASSI Jr; RASSI; REZENDE, 2012).

Inicialmente a doença limitava-se às áreas rurais, onde a transmissão vetorial era a principal forma de infecção, principalmente em locais de moradias precárias. Com o processo de urbanização e popularização da hemoterapia, a transmissão transfusional passou a ser prevalente (CORASSA *et al.*, 2017).

A implantação de programas de controle desenvolvidos pela Organização Pan-americana da Saúde em 2006, visando a eliminação do principal vetor (*Triatoma infestans*), além das mudanças sociais, econômicas e culturais, colaboraram para um maior controle da forma de transmissão vetorial (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015; CORASSA *et al.*, 2017). Também houve uma redução na transmissão transfusional com a intensificação da triagem sanguínea para doadores, diminuindo o número de casos no país (MORAES-SOUZA; FERREIRA-SILVA, 2011).

Atualmente, a maioria dos casos da doença de Chagas ocorre por transmissão oral, com cerca de 100 novos casos anualmente no Brasil, principalmente na região Amazônica (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015). A transmissão oral ocorre através da ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, como cana-de-açúcar, goiaba, bacaba e açaí, sendo este último o principal responsável por surtos ocorridos na região Amazônica (CARDOSO *et al.*, 2006; NÓBREGA *et al.*, 2009).

Recentemente foi relatado o primeiro surto agudo de doença de Chagas em Pernambuco ocorrido na cidade de Ibimirim, na mesorregião do sertão pernambucano, no mês de abril de 2019 durante um evento religioso em uma escola municipal. Setenta e sete pessoas foram expostas ao surto, dentre elas havia indivíduos sintomáticos (cefaleia, febre, dor abdominal, náuseas, eritema, dispneia, astenia, hepatomegalia, esplenomegalia, entre outros), bem como indivíduos sem nenhuma sintomatologia. Todos os indivíduos tiveram amostras submetidas ao diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* através de técnicas parasitológicas, sorológicas e molecular (qPCR) e estes foram submetidos ao tratamento segundo critério médico. Após investigações, foi confirmada a transmissão por via oral (dados não publicados).

Existem também relatos de transmissão congênita no país, a maioria no estado do Rio Grande do Sul (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015). A infecção congênita ocorre principalmente através da transferência do parasita por via transplacentária, podendo levar a prematuridade e baixo peso ao nascer (CARLIER; TRUYENS, 2017; HOWARD *et al.*, 2014). Devido à ausência de sintomas iniciais, assim como a inexistência de programas de rastreamento da doença em gestantes e recém-nascidos, muitos casos permanecem não detectados, levando a subnotificações (SANTOS *et al.*, 2018; VOLTA *et al.*, 2018).

Estudos recentes vêm sugerindo uma nova forma de transmissão da doença de Chagas através da via sexual. Pesquisas realizadas em camundongos demonstraram a transmissão da doença entre machos e fêmeas com parceiros não infectados através da relação sexual, confirmada por testes parasitológico, sorológico e molecular (RIOS *et al.*, 2018). A possibilidade de transmissão sexual em humanos também foi confirmada (ARAÚJO *et al.*, 2017).

## **2.2 Agente etiológico – *Trypanosoma cruzi***

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado pertencente ao filo *Sarcomastigophora*, subfilo *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família Trypanosomatidae.

Apresenta um núcleo relativamente pequeno de aproximadamente 2,5µm, uma membrana plasmática composta por bicamada lipídica e proteínas, organelas semelhantes às dos demais eucariotos e algumas estruturas típicas dos tripanossomatídeos, como o cinetoplasto, constituído por DNA extranuclear concentrado em uma região específica da mitocôndria (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* pode sofrer mudanças na sua estrutura apresentando diferentes formas evolutivas que podem ser identificadas por microscopia óptica através da coloração por Giemsa, sendo elas: tripomastigota, amastigota e epimastigota. A forma tripomastigota pode ser encontrada tanto no hospedeiro vertebrado (sangue e espaço intercelular) como no hospedeiro invertebrado (porção posterior do intestino e reto), a forma amastigota está presente no interior das células de mamíferos infectados, sendo o estágio de

replicação, e a forma epimastigota é encontrada apenas no tubo digestivo do vetor triatomíneo (SOUZA *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

O *T. cruzi* é um organismo diploide, com o genoma de aproximadamente 110,7Mb, sendo cerca de 50% composto por sequências repetitivas (EL SAYED *et al.*, 2005). O conteúdo de DNA total por célula varia de 125 a 280fg, incluindo o DNA do cinetoplasto (kDNA) que corresponde aproximadamente a 30% do DNA celular (HENRIKSSON; ASLUND; PETTERSSON, 1996). O kDNA está organizado em uma rede complexa de moléculas circulares formando maxicírculos, presentes em 20-50 cópias e minicírculos, presentes em 5.000 a 10.000 cópias (MYLER, 1993). Devido ao elevado número de cópias, os minicírculos do kDNA de *T. cruzi* possuem potencial para serem utilizados como alvo molecular na detecção do parasito por sistemas de PCR (STURM *et al.*, 1989).

O *T. cruzi* é uma população heterogênea de cepas com diversidade fenotípica e genética. Essa variação intraespecífica levou a classificação das cepas em diferentes grupos através de análises eletroforéticas de isoenzimas, inicialmente denominados de zimodemas (Z1 a Z3) (MILES *et al.*, 1977, 1978). Posteriormente, após análises genéticas utilizando marcadores nucleares específicos, essas cepas foram divididas em dois grandes grupos, *T. cruzi* I (TcI), associado ao ciclo silvestre na América Central e *T. cruzi* II (TcII), referente a cepas do ciclo doméstico (ZINGALES *et al.*, 2009). O TcII, após análises de *Randomly Amplified Polymorphic DNA* e *Multilocus Enzyme Electrophoresis*, foi ainda dividido em cinco subgrupos (IIa-IIe), enquanto o TcI permaneceu como uma linhagem única (ZINGALES *et al.*, 2012).

Atualmente, a classificação proposta é de seis DTUs (*discrete typing units*) correspondentes ao TcI e as subdivisões do TcII, além do Tcbat (restrita a quirópteros) (ZINGALES *et al.*, 2018). As DTUs apresentam diferenças quanto a virulência, taxa de crescimento, sensibilidade a drogas, entre outras características que podem estar associadas a diferenças na gravidade das manifestações clínicas, variando de acordo com a região geográfica (ZINGALES *et al.*, 2018).

### **2.3 Ciclo biológico do *T. cruzi***

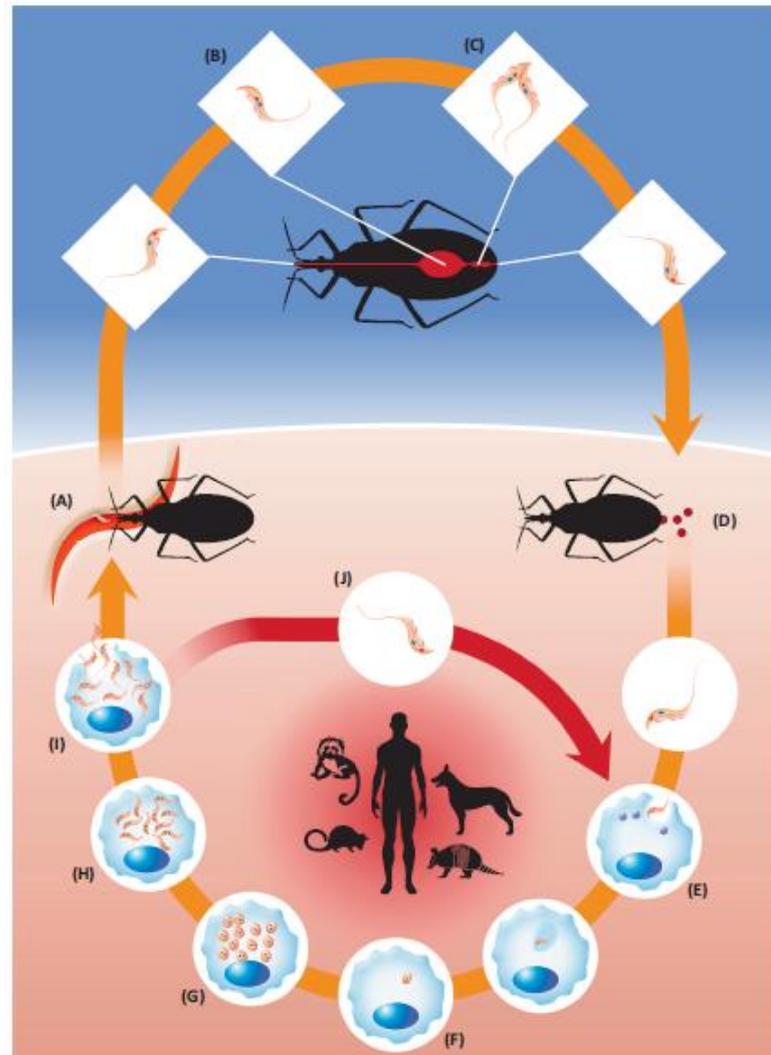
O *T. cruzi* possui um ciclo biológico complexo que envolve hospedeiros vertebrados (mamíferos de mais de 70 gêneros, tais como seres humanos, animais silvestres e animais domésticos) e hospedeiros invertebrados (insetos vetores triatomíneos) (ZINGALES *et al.*,

2018). Durante este processo, o parasita passa por quatro formas evolutivas alternadas: epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, no inseto vetor, e amastigotas e tripomastigotas, no hospedeiro mamífero (TYLER; ENGMAN, 2001).

O ciclo de vida do *T. cruzi* inicia quando o inseto vetor ingere tripomastigotas circulantes durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado. Na porção anterior do intestino médio do vetor, as tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, estágio de replicação no hospedeiro invertebrado. Posteriormente, as formas epimastigotas alcançam a região posterior do intestino, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicos que são eliminadas nas fezes do vetor (BERN, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Nos hospedeiros vertebrados, a infecção ocorre através do depósito de fezes contendo tripomastigotas metacíclicos pelo vetor sobre a pele lesionada ou mucosa. Após a penetração, o parasita alcança a corrente sanguínea e invade diferentes células nucleadas, formando vacúolos parasitóforos. No interior desses vacúolos se diferenciam em amastigotas, estágio de replicação no hospedeiro vertebrado. Como estratégia de sobrevivência, estes secretam toxinas que rompem a membrana dos vacúolos fusionados aos lisossomos e são liberados no citoplasma, onde se dividem por fissão binária e se diferenciam em tripomastigotas. Sucessivas replicações do parasita dentro da célula, resultam na lise celular, ocasionando a liberação das formas tripomastigotas na corrente sanguínea. As formas tripomastigotas livres podem invadir novas células, principalmente musculares (cardíacas, lisas e esqueléticas) e ganglionares e iniciar novos ciclos replicativos ou serem inoculadas por outros triatomíneos durante o repasto sanguíneo (BERN, 2015; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2014; RASSI Jr; RASSI; REZENDE, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2011) (Figura 2).

**Figura 2** - Desenho esquemático do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*



**Fonte:** Perez, Lymbery e Thompson (2014).

**Legenda:** O ciclo de vida do *T. cruzi*. (A) Triatomíneo realizando repasto sanguíneo contendo tripomastigotas no hospedeiro infectado (B) Diferenciação em epimastigota (C) Replicação por fissão binária e diferenciação em tripomastigota no intestino (D) Eliminação dos tripomastigotas nas fezes (E) Invasão nas células hospedeiras (F) Diferenciação em amastigotas (G) Replicação por fissão (H) Diferenciação em tripomastigotas (I) Lise da célula e liberação na corrente sanguínea (J) Invasão de novas células.

Podem existir divergências quanto a cinética do processo descrito e dos tecidos afetados de acordo com o tipo de cepa de *T. cruzi* envolvida, pois cada cepa apresenta características biológicas diferentes em relação a taxa de crescimento, parasitemia, virulência, tropismo tecidual e isso pode refletir diretamente na patogênese e conseqüentemente nas diferentes formas clínicas da doença (BUSCAGLIA; DI-NOIA, 2003; ZINGALES *et al.*, 2018).

## 2.4 Fases clínicas da doença

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas sucessivas: aguda e crônica. Na fase aguda, a maioria dos indivíduos são assintomáticos, contudo, alguns podem manifestar sintomas inespecíficos como febre, mal-estar, aumento do fígado, baço e linfonodos e edema subcutâneo. Nos casos de transmissão vetorial, alguns indivíduos podem apresentar sinal de porta de entrada, como o chagoma (nódulo inflamatório no local da inoculação) ou sinal de Romanã (inchaço no tecido periorbital), característicos da doença de Chagas (RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010; RASSI Jr; RASSI; REZENDE, 2012).

Em casos graves podem ocorrer manifestações cardíacas, como miocardite aguda e derrame pericárdico e mais raramente manifestações neurológicas, como meningoencefalite, responsáveis pela maioria das mortes nesta fase (LARANJA, 1956; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A fase crônica da doença de Chagas ocorre em um período de dois a três meses após a fase aguda (COURA; BORGES-PEREIRA, 2011). A maioria dos indivíduos nesta fase apresenta-se numa forma clínica assintomática definida inicialmente por Carlos Chagas como “quadro crônico indeterminado” (CHAGAS, 1916). Este conceito foi consolidado durante a I Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas em 1985, sendo essa forma clínica caracterizada pela ausência de sinais e sintomas da doença, positividade de exames sorológicos e/ou parasitológico, eletrocardiograma convencional normal e exames radiológicos do coração, esôfago e cólon normais (ANONYMOUS, 1985).

Apesar da maioria dos indivíduos permanecer na forma crônica indeterminada pelo resto da vida, cerca de 30% desenvolvem a forma clínica sintomática caracterizada pelo desenvolvimento de lesões cardíacas e/ou digestivas (BARRET *et al.*, 2003; RASSI Jr; RASSI; REZENDE, 2012).

A cardiomiopatia crônica é a forma clínica mais importante da doença e está associada principalmente a arritmias, distúrbios de condução, insuficiência cardíaca e morte súbita (MADY; NACRUTH, 1995). Alguns indivíduos podem apresentar distúrbios gastrointestinais manifestados como mega-síndromes, que envolvem principalmente o esôfago e o cólon (MATSUDA; MILLER; EVORA, 2009) ou podem ainda desenvolver lesões no sistema nervoso, envolvendo principalmente o parassimpático (CÓRDOVA *et al.*, 2010).

Tendo em vista o impacto social e médico-trabalhista das morbidades da doença de Chagas (DIAS, 1993; DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002), podemos destacar a importância de

estudos visando o diagnóstico cada vez mais eficiente dos indivíduos infectados, possibilitando um tratamento precoce, podendo interferir no prognóstico e na melhoria da qualidade de vida desses indivíduos.

## 2.5 Tratamento

Atualmente apenas dois compostos estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas: o benznidazol (produzido no Brasil pelo LAFEPE como Benznidazol LAFEPE® e na Argentina pela Maprimed/ELEA como Abarax®) e o nifurtimox (produzido na Alemanha pela Bayer HealthCare AG como Lampit™) (MUÑOZ; MURCIA; SEGOVIA, 2011).

São recomendados para os casos agudos, congênitos, reativados e indivíduos com idade inferior a 18 anos, pois apresentam maior tolerância aos medicamentos (DIAS *et al.*, 2016). Ambos os tratamentos são mais eficazes na fase aguda, com supressão da parasitemia e taxa de cura em torno de 80% (OLIVEIRA *et al.*, 2008), porém a resposta ao tratamento pode variar de acordo com o tipo de cepa albergada pelo hospedeiro (HABERLAND *et al.*, 2013).

Na fase crônica o uso do medicamento deve ser analisado de forma individual, avaliando a relação risco-benefício, apresentando controvérsias na sua utilização em casos avançados e em indivíduos maiores de 50 anos devido à incerteza na eficácia e elevada toxicidade (PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2009). O uso destes medicamentos pode acarretar vários efeitos colaterais, tais como hipersensibilidade, linfadenopatia, polineuropatia periférica e depressão da medula óssea (PRATA, 2001).

## 2.6 Diagnóstico laboratorial

Os critérios laboratoriais para definição do diagnóstico da doença de Chagas foram preconizados pelo II Consenso Brasileiro em doença de Chagas financiado pelo Ministério da Saúde do Brasil em 2015 e determina a utilização de diferentes técnicas laboratoriais de acordo com a fase da doença (DIAS *et al.*, 2016).

Na fase aguda, os exames parasitológicos são os mais indicados devido à elevada parasitemia apresentada pelos indivíduos nessa fase. Quando estes forem negativos, mas as suspeitas clínica e epidemiológica persistirem, devem ser utilizados métodos sorológicos. Na fase crônica, o exame parasitológico apresenta baixa sensibilidade devido a parasitemia

subpatente e por isso não é recomendado, sendo essencial o diagnóstico sorológico (BRASIL, 2019; DIAS *et al.*, 2016).

### 2.6.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico é considerado padrão ouro na fase aguda e se baseia na identificação de tripomastigotas de *T. cruzi* presentes no sangue periférico. Para confirmação de caso recomenda-se a utilização simultânea de diferentes métodos, sendo os mais utilizados: pesquisa direta a fresco, lâmina corada de gota espessa ou esfregaço e métodos de concentração (DIAS *et al.*, 2016).

A pesquisa a fresco é um método simples e rápido de diagnóstico que se baseia na adição de uma gota de sangue entre a lâmina e a lamínula e a busca pelas formas infectantes (tripomastigotas) utilizando o microscópio óptico. É considerado o método de escolha para o diagnóstico na fase aguda inicial, devendo ser realizada preferencialmente em amostras coletadas de paciente febril com 30 dias do início dos sintomas (DIAS *et al.*, 2016; LUQUETTI; SCHMUÑIS, 2010).

Outra forma de diagnóstico parasitológico é através da realização de um esfregaço sanguíneo seguido de coloração com Giemsa ou com solução de Wright ou através da gota espessa seguida pela coloração pelo método de Walker, que consiste basicamente na ruptura das hemácias e leucócitos seguidos de coloração com Giemsa (MEIS; CASTRO, 2017).

A sensibilidade da pesquisa a fresco é maior em comparação a lâmina corada (LUQUETTI; SCHMUÑIS, 2010), contudo esta última ainda é bastante utilizada na região da Amazônia Legal devido a facilidade de utilização integrada às ações de diagnóstico da malária (BRASIL, 2017; DIAS *et al.*, 2016).

Em casos sintomáticos de mais de 30 dias de evolução, devido a diminuição da parasitemia, recomenda-se a utilização de métodos de concentração, como o método de Strout e microhematócrito (DIAS *et al.*, 2016). O método de Strout é o mais sensível entre os métodos de concentração, apresentando uma sensibilidade de aproximadamente 96% para a detecção de casos agudos. Trata-se de uma técnica que tem como objetivo a concentração do parasita no sedimento após centrifugação em alta velocidade do soro obtido de uma amostra de sangue (LUQUETTI; RASSI, 2000).

O microhematócrito consiste basicamente no preenchimento de um microcapilar com a amostra de sangue seguido de centrifugação e posterior avaliação da camada leucocitária em microscópio óptico (MEIS; CASTRO, 2017). Devido a utilização de um menor volume de amostra em comparação ao método de Strout, é recomendado em casos suspeitos de infecção congênita nos estágios iniciais, pois a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* circulantes maternos limitam a utilização do diagnóstico sorológico (DIAS *et al.*, 2016; FEILIJ; MULLER; CAPPA, 1983).

Apesar da facilidade de execução e baixo custo, uma das principais limitações dos métodos de concentração é que as amostras devem ser examinadas em até 24 horas, devido à possível lise dos parasitos (DIAS *et al.*, 2016; LUQUETTI; RASSI, 2000; LUQUETTI; SCHMUÑIS, 2010).

Em geral, apesar do diagnóstico parasitológico ser considerado padrão ouro na fase aguda, apresenta algumas limitações, como a sensibilidade dependente da habilidade do operador, sendo necessário um microscopista bem treinado, além do tempo prolongado para o resultado (LINDER *et al.*, 2008; PORRÁS *et al.*, 2015). Além disso, a sensibilidade dessas técnicas depende do nível de parasitemia do indivíduo, representando desta forma uma importante limitação para o diagnóstico na fase crônica da doença (DIAS *et al.*, 2016).

### 2.6.2 Diagnóstico sorológico

O diagnóstico sorológico é o método de primeira escolha para indivíduos na fase crônica da infecção, sendo também utilizado como método complementar de diagnóstico na fase aguda. As técnicas mais utilizadas são a hemaglutinação indireta, a imunofluorescência indireta e o método imunoenzimático (ELISA) (BRASIL, 2017; DIAS *et al.*, 2016).

Na fase aguda, quando não se identifica o parasita pelos métodos parasitológicos, deve ser realizada a pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM, sempre estando associada com achados clínicos e dados epidemiológicos. É mais indicada para fase aguda tardia, contudo, pode apresentar resultados falso-positivos com outras doenças febris (BRASIL, 2013, 2017).

Existe uma dificuldade na implementação de kits sorológicos comerciais aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a fase aguda da doença e por isso o diagnóstico precisa ser realizado em um laboratório de referência (DIAS *et al.*, 2016).

Na fase crônica, para confirmação diagnóstica, deve ser realizada a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG através de dois métodos sorológicos com princípios distintos ou com diferentes preparações antigênicas. Uma das técnicas utilizadas para o diagnóstico deve possuir elevada sensibilidade (ELISA com antígeno total ou imunofluorescência indireta) e a outra elevada especificidade (hemaglutinação indireta) (DIAS *et al.*, 2016).

A técnica de ELISA é a mais utilizada entre os métodos sorológicos, pois apresenta elevada sensibilidade e especificidade, dependendo do antígeno utilizado, além da capacidade de processamento de grande quantidade de amostras rapidamente (MARCIPAR; LAGIER, 2012). Para o diagnóstico da doença de Chagas é utilizado o ELISA indireto que se baseia na detecção de anticorpos presentes no soro utilizando antígenos fixados em uma superfície insolúvel e um segundo anticorpo (anti-imunoglobulina humana) conjugado a uma enzima, que na presença do seu substrato específico gera um produto de cor quantificado através da espectrofotometria (VOLLER; BIDWELL; BARTLETT, 1976).

Voller *et al.* (1975) foi o primeiro a descrever a utilização do ELISA para o diagnóstico da doença de Chagas, demonstrando uma boa correlação com os resultados obtidos pela imunofluorescência indireta e xenodiagnóstico (VOLLER *et al.*, 1975). A partir de então, vários estudos com uma diversidade de protocolos foram descritos utilizando a técnica de ELISA com esta finalidade.

Brasil *et al.* (2010) realizaram uma revisão sistemática e metanálise para descrever a sensibilidade e especificidade dos ensaios de ELISA convencionais e ELISA que utilizam antígenos recombinantes para o diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica. Foram relatados valores altos, tanto de sensibilidade como de especificidade, para o ELISA convencional (97,7% e 96,3%) e para o ELISA comercial com antígenos recombinantes (99,3% e 97,5%) (BRASIL *et al.*, 2010). Apesar disso, vários estudos ainda recomendam a utilização de testes combinados para o diagnóstico preciso na doença na fase crônica, demonstrando questionamentos a respeito desta elevada precisão (AFONSO; EBELL; TARLETON, 2012).

Uma das técnicas sorológicas convencionais utilizadas em combinação com o ELISA é a hemaglutinação indireta. Descrita inicialmente por Cerisola e colaboradores (1962), a técnica se baseia na aglutinação de hemácias sensibilizadas com antígenos de *T. cruzi* na presença da amostra do indivíduo suspeito contendo anticorpo contra o parasita (CERISOLA; CHABEN; LAZZARI, 1962). Apresenta como vantagens a maior simplicidade de execução e dispensa o uso de equipamentos sofisticados (LUQUETTI; CASTRO, 1997).

Outra técnica bastante utilizada é a imunofluorescência indireta. A técnica se baseia na interação do anticorpo anti-*T. cruzi* presente no soro do indivíduo contra formas epimastigotas fixadas numa lâmina. Para visualização do resultado é utilizado um anticorpo anti-imunoglobulina humana conjugado a um revelador que emite fluorescência quando ocorre a reação antígeno-anticorpo (CAMARGO, 1974).

A utilização da técnica de imunofluorescência indireta para o sorodiagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* foi descrita pela primeira vez por Fife e Muschel (1959) e otimizada por Souza e Camargo *et al.* (1966). Este teste apresenta elevada sensibilidade (99%), contudo a leitura do resultado é subjetiva, sendo necessário um técnico qualificado para interpretação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002).

Apesar do diagnóstico sorológico ser considerado padrão ouro na fase crônica, algumas limitações como o risco de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos presentes em áreas endêmicas, como *Leishmania* sp. e *Trypanosoma rangeli* (CABALLERO *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2015), além da permanência da positividade por anos mesmo após o tratamento específico, limitam sua utilização na avaliação da eficácia terapêutica (GALVÃO *et al.*, 1993). Além disso, problemas de padronização afetam a precisão e reprodutibilidade dessas técnicas, sendo mais um limitante (BRASIL; CASTRO R.; CASTRO L., 2016).

### 2.6.3 Diagnóstico molecular

Devido às limitações encontradas no diagnóstico da doença de Chagas pelas técnicas convencionais, como a baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos na fase crônica, a ocorrência de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos através do diagnóstico sorológico, a dificuldade no diagnóstico da infecção congênita nos primeiros meses de vida, além da dificuldade no acompanhamento da resposta ao tratamento por métodos sorológicos, torna-se necessária a busca por novas ferramentas diagnósticas (ALONSO-PADILLA *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2016; SCHIJMAN *et al.*, 2018).

Métodos moleculares baseados na detecção do DNA de *T. cruzi*, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sua variante PCR quantitativa em tempo real (qPCR), vêm demonstrando potencial, principalmente para o monitoramento da carga parasitária na fase crônica, na detecção precoce da infecção congênita e no acompanhamento da resposta ao tratamento (ALONSO-PADILLA *et al.*, 2017; OLIVEIRA, 2020; SCHIJMAN *et al.*, 2011).

Davila *et al* (2018) utilizaram a qPCR para detecção e quantificação da carga de *T. cruzi* em amostras de sangue de 91 pacientes crônicos, comparando os resultados com a técnica de hemocultura. A hemocultura foi positiva em 49,6% dos casos, enquanto a qPCR foi positiva em 58,5%. O método qPCR mostrou maior potencial para diagnosticar e estimar a carga parasitária, mesmo em situação de baixa parasitemia, demonstrando seu potencial no diagnóstico e monitoramento da carga parasitária em pacientes crônicos (D'ÁVILA *et al.*, 2018).

Estratégias moleculares baseadas em PCR também vêm se mostrando eficientes na detecção precoce da infecção congênita (MESSENGER *et al.*, 2018; VELÁZQUEZ *et al.*, 2014; VIRREIRA *et al.*, 2003). O diagnóstico precoce é importante para garantir um tratamento tripanocida eficiente, demonstrando uma alta taxa de cura quando realizado antes de 1 ano de idade (CALIER, *et al.*, 2011; MESSENGER *et al.*, 2018; PICADO *et al.*, 2018).

Virreira *et al.* (2003) compararam a sensibilidade de diferentes sistemas de PCR com a finalidade de aprimorar a detecção da infecção neonatal. O sistema com melhor desempenho (*primers* Tcz1 e Tcz2) demonstrou sensibilidade de 1 fg e foi aplicado no diagnóstico da infecção congênita em amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos, filhos de mães infectadas e não infectadas. A técnica se mostrou eficiente para detecção de todos os casos positivos em concordância com o diagnóstico padrão e demonstrou ser uma ferramenta útil para o diagnóstico da doença de Chagas congênita (VIRREIRA *et al.*, 2003).

Uma das principais aplicabilidades da qPCR vêm sendo no monitoramento da eficácia terapêutica (RAMÍREZ *et al.*, 2017). Devido às limitações das técnicas sorológicas para esta finalidade, a qPCR vêm sendo recomendada como metodologia alternativa para o controle de cura, apesar de ainda ser restrita a atividades de pesquisa (DIAS *et al.*, 2016).

Um estudo utilizando diversos protocolos de qPCR foi realizado com o objetivo de estabelecer uma metodologia padronizada para acompanhamento da parasitemia em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica, submetidos a quimioterapia com benzonidazol. Foram utilizados como alvo tanto o DNA satélite (*satDNA*) como o DNA do cinetoplasto (*kDNA*), e foram comparados sistemas de Sybr Green e de Taqman. A qPCR utilizando Sybr Green apresentou melhor custo-benefício e sensibilidade adequada para detecção de baixa carga parasitária (MOREIRA *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram o potencial da qPCR como um método adequado para quantificar carga parasitária e para o monitoramento da eficácia terapêutica,

corroborando com os resultados encontrados em outros estudos (DUFFY *et al.*, 2009; PIRON *et al.*, 2007; RAMÍREZ *et al.*, 2017).

De maneira geral, apesar das vantagens demonstradas pela PCR convencional e qPCR, devido à ausência de protocolos definidos e procedimentos padronizados, estas não podem ser consideradas como método de diagnóstico isolado para confirmação de caso de doença de Chagas aguda ou crônica. Além disso, a necessidade de laboratórios bem equipados e o alto custo de execução restringem a aplicação destes testes a laboratórios de referência, tornando evidente a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas que possam ser implementadas em áreas com poucos recursos (DIAS *et al.*, 2016).

## **2.7 Amplificação isotérmica em alça (LAMP)**

Apesar dos métodos moleculares citados apresentarem diversas vantagens, como a elevada sensibilidade e especificidade e principalmente a capacidade de serem utilizados para o monitoramento da carga parasitária e da eficácia do tratamento, algumas características como a necessidade de equipamentos sofisticados e o alto custo de execução, dificultam a implementação na rotina laboratorial, principalmente em países em desenvolvimento (JAMES; MACDONALD, 2015).

Desta forma, a técnica molecular de amplificação isotérmica em alça (*Loop-mediated isothermal amplification*) vêm demonstrando potencial como uma possível ferramenta para o diagnóstico e vigilância de doenças infecciosas (MORI; KANDA; NOTOMI, 2013; MORI; NOTOMI, 2009, 2020;).

### **2.7.1 Princípios básicos da técnica**

A amplificação isotérmica em alça (LAMP) é uma técnica molecular desenvolvida por Notomi e colaboradores em 2000 com o objetivo de amplificar milhares de vezes um fragmento da molécula de DNA, em condições isotérmicas, com elevada especificidade, rapidez e eficiência (NOTOMI *et al.*, 2000). É considerada uma técnica simples e com um bom custo-benefício, por não necessitar de equipamentos sofisticados como o termociclador (DEA-AYUELA *et al.*, 2018), atraindo interesse para o uso no campo ou diagnóstico no ponto de atendimento em áreas endêmicas com poucos recursos (JAMES; MACDONALD, 2015; NJIRU, 2012).

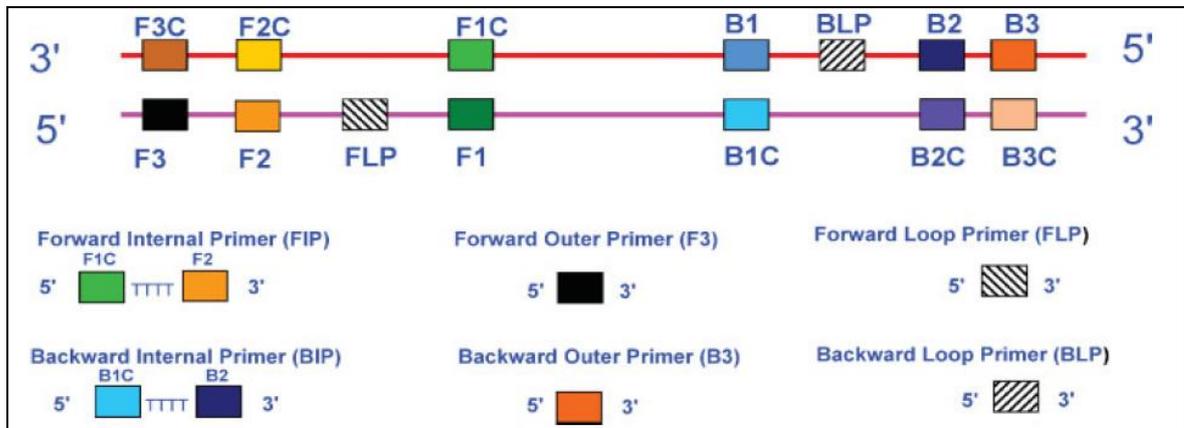
A técnica consiste basicamente na adição de reagentes termoestáveis como tampão, dNTPs, MgSO<sub>4</sub>, betaína e *primers* em um tubo juntamente com a enzima Bst DNA polimerase e o DNA de interesse, onde serão submetidos a uma temperatura constante de aproximadamente 60-65°C para que ocorra o processo de amplificação do DNA alvo (TANNER; EVANS, 2014; TOMLINSON, 2012).

A enzima Bst DNA Polimerase, extraída do *Bacillus stearothermophilus*, possui a capacidade de abrir a dupla hélice de DNA ao mesmo tempo que realiza a polimerização da nova fita (NOTOMI *et al.*, 2000). Além disso, tem como uma importante característica a maior tolerabilidade a inibidores presentes em amostras clínicas, representando uma vantagem em relação as utilizadas na PCR convencional, pois podem ser utilizadas amostras sem extração prévia de DNA, diminuindo o tempo e custo do processo (NOTOMI *et al.*, 2015; ZHANG; LOWE; GOODING, 2014).

Inicialmente, a técnica foi descrita utilizando dois pares de *primers*, um par interno denominado FIP (*foward inner primer*) e BIP (*backward inner primer*) e um par externo denominado F3 e B3 (*outter primers*) (NOTOMI *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2017). O *primer* FIP apresenta uma estrutura composta por uma região F1c e uma região F2 complementar ao sítio F2c da fita de DNA alvo. Já o *primer* BIP apresenta uma região denominada B1c e uma região B2, que hibridiza na sequência B2c da fita alvo (PARIDA *et al.*, 2008).

Posteriormente foram desenvolvidos por Nagami e Notomi (2002) *primers* do loop que foram denominados de FLP (*forward loop primer*) e BLP (*backward loop primer*). Estes se anelam nas regiões que não são acessadas pelos *primers* internos, entre as sequências F1 e F2 (FLP) e entre B1 e B2 (BLP) (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002). A adição desses *primers* é facultativa, mas seu uso aumenta a velocidade da reação e garante uma maior sensibilidade para a técnica (LI *et al.*, 2017) (Figura 3).

**Figura 3** - Esquema representativo dos *primers* de LAMP



Fonte: Parida *et al.* (2008).

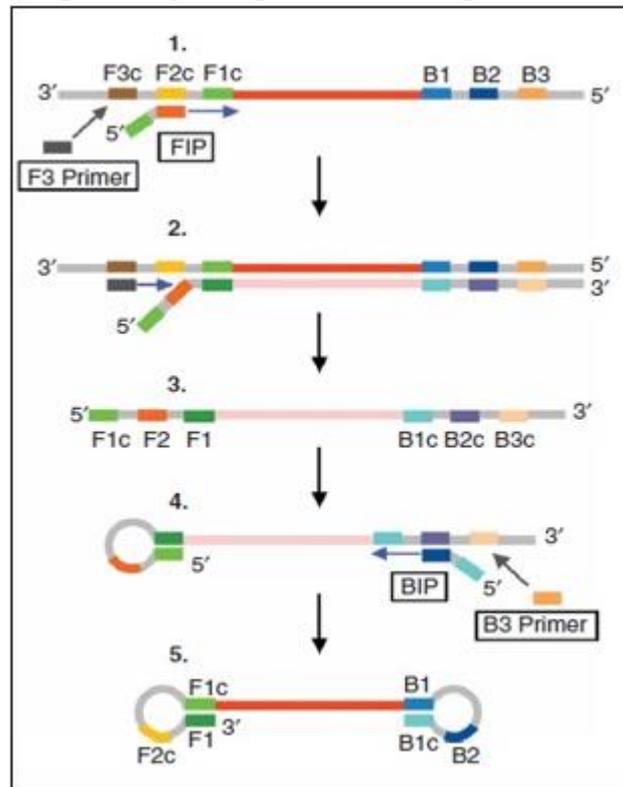
### 2.7.2 Etapas de reação de LAMP

A reação de LAMP pode ser dividida em duas etapas: etapa não cíclica e etapa cíclica (PARIDA, 2008). Na etapa não cíclica atuam os *primers* externos e internos e o produto formado é utilizado como molde para a etapa cíclica. Nesta última etapa ocorre a ação apenas dos *primers* internos e ao final da reação, em aproximadamente 1 hora, são formadas  $10^9$  cópias do DNA alvo (ZHAO *et al.*, 2015).

A etapa não cíclica inicia-se quando ocorre a elevação da temperatura e a enzima Bst DNA polimerase torna-se ativa, iniciando a abertura da dupla fita de DNA. Após isso, o *primer* interno FIP hibridiza na região F2c através da sua região complementar F2 e a enzima realiza a síntese da nova fita. Em seguida, o *primer* externo F3 se liga a região F3c da fita alvo e a enzima realiza a extensão de uma nova fita complementar. Contudo, à medida que esta síntese acontece, ocorre o deslocamento da fita anteriormente sintetizada a partir do *primer* FIP e como esta apresenta regiões auto complementares (F1c e F1) ocorre a formação de um loop na extremidade 5' nesta região (PARIDA *et al.*, 2008; TOMITA *et al.*, 2008).

A fita simples liberada nesta primeira fase de reação é utilizada como molde, ocorrendo o anelamento do *primer* interno BIP na região B2c da extremidade 3' e novamente a enzima DNA polimerase realiza a extensão da nova fita. Em seguida, o *primer* externo B3 hibridiza na região B3c e a síntese a partir desse *primer* provoca o deslocamento da fita anteriormente sintetizada a partir do BIP, semelhante ao que ocorre na outra extremidade. Desta forma, a fita liberada apresentará uma estrutura com dois loops, um em cada extremidade, semelhante a um haltere, necessária para a etapa cíclica (PARIDA *et al.*, 2008; TOMITA *et al.*, 2008) (Figura 4).

**Figura 4** - Representação esquemática da etapa não-cíclica de LAMP



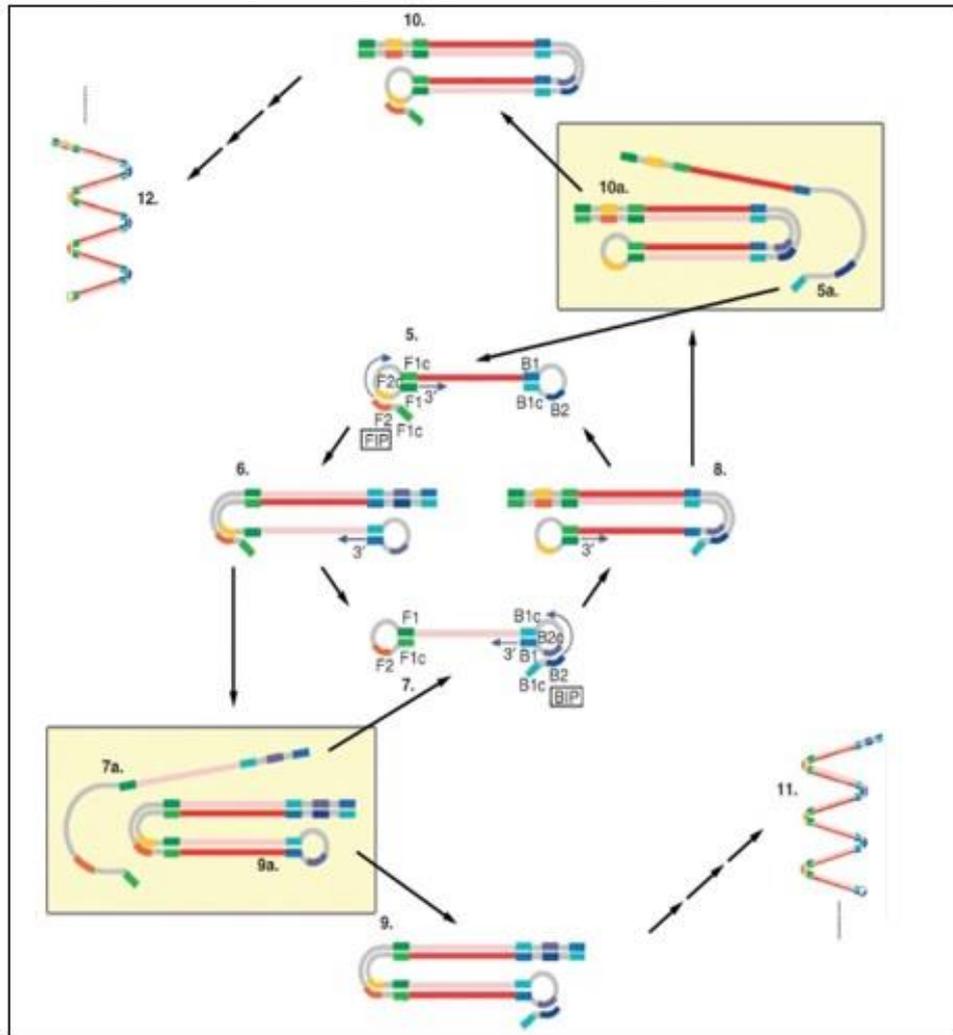
**Fonte:** Adaptada de Tomita *et al.* (2008).

Na etapa cíclica apenas os *primers* internos atuarão, pois as regiões reconhecidas pelos *primers* externos (F3c e B3c) não estarão presentes na fita molde formada na etapa não cíclica. A etapa cíclica inicia-se quando ocorre o anelamento do *primer* FIP na região F2c presente no *loop* da extremidade 3' e a síntese de uma nova fita é iniciada pela enzima. Simultaneamente, na extremidade 3' livre da região F1 da fita molde, é realizada a síntese de uma outra fita de DNA que possuirá na extremidade uma região auto complementar B1 e B1c, levando a formação de um *loop*. A partir da extremidade 3' livre presente neste *loop* formado, ocorre um processo de autoativação da síntese, ou seja, ocorre a formação de uma nova fita de DNA continuamente, liberando a fita anteriormente formada a partir do *primer* FIP (NOTOMI *et al.*, 2000; PARIDA *et al.*, 2008; TOMITA *et al.*, 2008).

Nesta fita liberada ocorre a hibridização do *primer* BIP na região B2c do *loop* na extremidade 5' e a enzima Bst DNA polimerase realiza a síntese de uma nova fita complementar. O processo de autoativação da síntese ocorre semelhantemente nesta extremidade até a liberação da fita formada pelo BIP. Neste processo, diversas estruturas de

tamanhos e formas diferentes são liberadas até que os *primers* internos sejam consumidos (NOTOMI *et al.*, 2000; PARIDA *et al.*, 2008; TOMITA *et al.*, 2008) (Figura 5).

**Figura 5** - Representação esquemática da etapa cíclica de LAMP



Fonte: Adaptada de Tomita *et al.* (2008).

### 2.7.3 Formas de visualização do resultado

Os produtos da reação de LAMP podem ser detectados de diferentes formas, pela turvação, mudança de cor ou fluorescência (OSCORBIN *et al.*, 2016), tendo como principal vantagem a capacidade de visualização do resultado no próprio tubo a olho nu, reduzindo a necessidade de equipamento sofisticados (DEA-AYELA *et al.*, 2018).

Um dos métodos de visualização mais simples é através da detecção da turvação do produto de reação que ocorre devido a formação de pirofosfato de magnésio durante o processo de

amplificação. O pirofosfato, liberado dos dNTPs utilizados como substratos, possui afinidade por íons metálicos como o magnésio presente na reação, se ligando a este e formando como produto um sal insolúvel que pode ser visualizado a olho nu como um precipitado branco no tubo. Esta turbidez é proporcional a quantidade de DNA amplificado. É uma forma de visualização simples e de baixo custo, contudo a interpretação dos resultados é subjetiva (MORI *et al.*, 2001; TOMITA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2014).

Outra forma de detecção dos produtos da reação de LAMP é através da visualização colorimétrica utilizando corantes como o azul de hidroxinaftol (HNB) ou verde de malaquita. O HNB serve como um indicador para íons de metais alcalinos terrosos. É utilizado antes da reação de amplificação, reagindo com o íon magnésio tornando a coloração violeta. Em caso de positividade, ocorre modificação da cor da reação de violeta para azul devido ao consumo do magnésio. As principais vantagens dessa técnica é a redução da chance de contaminação e a possibilidade de visualização dos resultados mesmo após duas semanas do procedimento, contudo a principal desvantagem é a dificuldade na interpretação visual dos resultados em amostras com baixa amplificação (GOTO *et al.*, 2009).

Além disso, a detecção também pode ser feita através da fluorescência utilizando corantes como o Sybr Green e a calceína. A calceína, assim como o corante HNB é um indicador de íons metálicos. Quando adicionada na reação juntamente com o íon manganês forma um complexo que não emite fluorescência visível. Porém, durante o processo de amplificação, ocorre liberação de íons pirofosfato que possuem maior afinidade com o íon divalente ( $Mn^{2+}$ ) desfazendo o complexo, deixando a calceína livre. A calceína livre emite fluorescência sob luz UV, desta forma, a reação positiva pode ser identificada. A calceína também é capaz de se ligar ao íon magnésio na reação, aumentando a emissão de fluorescência (TOMITA *et al.*, 2008).

Já o Sybr Green é um corante fluorescente intercalante de DNA fita dupla. É adicionado ao final da reação, diretamente no produto, se ligando a qualquer DNA fita dupla formado (LIU *et al.*, 2017; NJIRU, 2012). Em caso de positividade, a cor do produto de reação muda de laranja para verde fluorescente e essa mudança pode ser visualizada tanto sob luz natural, como por luz UV (PARIDA *et al.*, 2008).

Apesar de haver inúmeros métodos para rápida identificação do processo de amplificação, a eletroforese em gel de agarose ainda é o método de detecção mais comumente utilizado. Diferentemente do que é visto na PCR convencional, o resultado do LAMP apresenta-se como

um padrão de bandas manchadas em escada, devido a formação de produtos de diferentes tamanhos moleculares durante a reação (NOTOMI *et al.*, 2000).

#### 2.7.4 Aplicação da técnica de LAMP na detecção do DNA de *T. cruzi*

A técnica de LAMP tem sido vista como uma ferramenta promissora para o diagnóstico de doenças parasitárias negligenciadas, como tripanossomíase africana, leishmaniose, esquistossomose, filariose, entre outras, principalmente em regiões de recursos limitados onde estas doenças são endêmicas (AVENDAÑO; PATARROYO, 2020; DEA-AYUELA *et al.*, 2018). Alguns estudos vêm demonstrando o potencial da técnica para detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* (Quadro 1).

**Quadro 1** – Publicações relatando a utilização da técnica da LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas

(Continua)

<b>Marcador molecular</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Nº de amostras</b>	<b>Sensibilidade analítica</b>	<b>Referência</b>
18S rRNA	Cepa Tulahuen	-	1fg	Thekiso <i>et al</i> (2007)
18S rRNA	Cepa Tulahuen/ Insetos triatomíneos	- 52	100fg	Thekiso <i>et al</i> (2010)
18S rRNA	Amostras de sangue humano	27	50 parasitas/mL	Rivero <i>et al</i> (2017)
Sequência repetitiva de DNA satélite	Cepas de seis DTUs/ Amostras de sangue humano	- 33	DNA cepas TcI e TcVI: 1 x 10 <sup>-2</sup> fg/μL	Besuschio <i>et al</i> (2017)

**Quadro 1** – Publicações relatando a utilização da técnica da LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas

(Continuação)

<b>Marcador molecular</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Nº de amostras</b>	<b>Sensibilidade analítica</b>	<b>Referência</b>
Sequência repetitiva de DNA satélite	Amostras de sangue humano	46	1 x 10 <sup>-2</sup> fg/μL (Besuschio <i>et al.</i> , 2017)	Besuschio <i>et al</i> (2020)
Sequência repetitiva de DNA satélite (231pb)	Cepa CL Brener e cepa DM28	-	CL Brener: 5fg DM28: 50fg	Ordóñez <i>et al</i> (2020)
Sequência repetitiva de DNA satélite	Amostras de sangue humano	295	1 x 10 <sup>-2</sup> fg/μL (Besuschio <i>et al.</i> , 2017)	Flores-Chavez <i>et al</i> (2021)

**Fonte:** Adaptado de Avendaño e Patarroyo (2020).

Thekisoe e colaboradores foram os primeiros a desenvolverem um sistema de LAMP para detecção do DNA de espécies e subespécies de tripanossomas que incluía o *T. cruzi*. Utilizaram *primers* desenhados tendo como alvo molecular genes conservados entre os tripanossomatídeos, como o 18S rRNA. O sistema descrito apresentou elevada especificidade e sensibilidade, sendo capaz de detectar até 1fg de DNA, demonstrando o potencial da técnica como método alternativo de diagnóstico molecular em áreas com poucos recursos (THEKISOE *et al.*, 2007).

Em estudos posteriores realizados por este mesmo grupo, foi desenvolvido um sistema de LAMP com seis *primers*, incluindo os *primers* do loop, sendo utilizado para detecção de DNA de *T. cruzi* em insetos vetores *Rhodnius pallescens*. O sistema desenvolvido foi comparado aos resultados da PCR convencional. O limite de detecção do sistema foi de 100 fg e quando avaliado frente as amostras do vetor, foi observada uma pequena diferença de desempenho entre a LAMP e a PCR convencional, pois de um total de 52 amostras, 17 foram positivas pelo LAMP e 14 foram positivas na PCR convencional. Estes resultados sugeriram a utilização do LAMP

na detecção de *T. cruzi* em amostras clínicas, amostras de sangue para transfusão e transplante de órgãos (THEKISOE *et al.*, 2010).

Em 2017, Rivero e colaboradores foram os primeiros a aplicarem a técnica de LAMP para detecção de *T. cruzi* em amostras clínicas. Eles utilizaram amostras de bebês nascidos de mães infectadas e o ensaio foi desenvolvido adaptando os *primers* descritos por Mikita *et al.* (2014) para *Leishmania sp.* O sistema apresentou 100% de concordância com as técnicas de diagnóstico convencional (parasitológico e sorológico) demonstrando a capacidade da técnica no diagnóstico da forma congênita da doença de Chagas. Contudo, houve reação cruzada com DNA de *L. braziliensis* e *T. rangeli*, demonstrando que sua utilização poderia gerar resultados falso positivos em locais onde estes parasitas coabitam. Além disso, a sensibilidade analítica limitada do sistema (50 parasitas/mL) utilizando *primers* direcionados a região 18S rRNA sugeriram a possibilidade de aperfeiçoando da técnica através da utilização de *primers* direcionados a regiões do genoma com maior número de cópias, como por exemplo, o DNA satélite (RIVERO *et al.*, 2017).

Besuschio e colaboradores (2017) foram os primeiros a desenvolverem um kit protótipo de LAMP (*Trypanosoma cruzi* Loopamp) para o diagnóstico da doença de Chagas com elevada sensibilidade (0,01 fg). Eles utilizaram como alvo sequências repetitivas de DNA satélite de *T. cruzi* e o sistema foi aplicado em amostras de pacientes com várias formas clínicas da doença (aguda, crônica, congênita e reativa), sendo os resultados comparados com a qPCR. De um total de 23 amostras, o sistema foi capaz de detectar todas as amostras de pacientes com as formas congênita, aguda e reativada e 4 de 10 amostras de pacientes na fase crônica, apresentando uma discreta diferença de sensibilidade quando comparado a qPCR (3 de 10 amostras) (BESUSCHIO *et al.*, 2017).

Posteriormente, estes mesmos autores avaliaram a precisão diagnóstica do kit em amostras de 46 pacientes com doença de Chagas aguda (pacientes com a forma congênita, receptores de órgãos de doadores com doença de Chagas, pacientes com a forma oral e coinfectados com HIV com risco de reinfecção), apresentando 93% de sensibilidade e 100% de especificidade utilizando a qPCR como teste de referência (BESUSCHIO *et al.*, 2020). Estes resultados demonstraram o potencial da técnica de LAMP no diagnóstico de pacientes em diferentes cenários clínicos.

Ordóñez e colaboradores (2020) desenvolveram um sistema baseado em LAMP (Tc-LAMP) para o diagnóstico da doença de Chagas, utilizando uma sequência repetitiva de DNA

satélite como marcador molecular para detecção de diferentes linhagens. O sistema apresentou uma sensibilidade de 5 fg para a cepa CL Brener (referente aos parasitas envolvidos no ciclo doméstico) e 50 fg para a cepa Dm28 (referente aos parasitas envolvidos no ciclo selvagem) e não houve reação cruzada com helmintos e protozoários avaliados, incluindo *Leishmania* spp., reforçando sua importância como uma técnica precisa e facilmente adaptável em áreas de recursos limitados (ORDÓÑEZ *et al.*, 2020).

Recentemente, Flores-Chavez *et al.* (2021) avaliaram o desempenho do kit *Trypanosoma cruzi* Loopamp (Eiken Chemical Co. Ltd., Japan) no diagnóstico da doença de Chagas na Espanha, área não endêmica para a doença. Foram utilizadas amostras de 39 pacientes com a forma congênita, 48 amostras de crianças não infectadas nascidas de mães infectadas, 174 amostras de pacientes crônicos e 34 amostras de indivíduos não chagásicos. A sensibilidade, especificidade e acurácia do LAMP foram avaliadas em comparação com o padrão-ouro para cada fase. Para a doença de Chagas congênita a sensibilidade foi de 97%, especificidade de 92-94% e acurácia de 94%. Já para a doença de Chagas crônica a sensibilidade foi de 47%, especificidade de 100% e acurácia de 56%. Neste estudo também foi avaliada a concordância entre o kit de LAMP e a técnica de qPCR. Para a doença de chagas congênita a concordância foi maior ( $k=0,86$  a  $0,91$ ) que para a crônica ( $k=0,67$  a  $0,83$ ), demonstrando o potencial deste kit no diagnóstico precoce da infecção congênita (FLORES-CHAVEZ *et al.*, 2021).

Em nossa proposta, sistemas de amplificação isotérmica em alça (LAMP) foram desenvolvidos para detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras de indivíduos na fase aguda da doença de Chagas. Este estudo tem como objetivo propor uma ferramenta diagnóstica rápida, eficaz e que requer poucos investimentos, podendo ser facilmente implementada nos serviços de saúde.

### 3 JUSTIFICATIVA

Mesmo após um século da descoberta, a doença de Chagas continua sendo negligenciada, permanecendo como um importante problema de saúde pública principalmente na América Latina. No Brasil, as ocorrências recentes de surtos por transmissão oral reforçam a necessidade de ações que visam o combate à doença. Uma importante medida de controle é o diagnóstico laboratorial, pois quando realizado de forma eficiente pode direcionar ao rápido tratamento, podendo interferir no prognóstico da doença. Além disso, o diagnóstico eficaz na fase crônica também é necessário para o acompanhamento da resposta ao tratamento e manutenção da qualidade de vida dos indivíduos infectados.

Entretanto, os métodos diagnósticos estabelecidos tanto para a fase aguda, como para a fase crônica apresentam limitações. Na fase aguda, os métodos parasitológicos apresentam variações de sensibilidade, dependendo da habilidade do microscopista, além do tempo prolongado para o resultado e na fase crônica, os métodos sorológicos apresentam problemas de reações cruzadas, além da permanência de positividade mesmo após o tratamento, dificultando o acompanhamento da eficácia terapêutica.

Alguns métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e sua variante (qPCR) vêm sendo propostos para o diagnóstico da doença de Chagas, no entanto, a necessidade de equipamentos sofisticados e o alto custo de execução dificultam sua implementação em áreas de recursos limitados. Desta forma, a técnica de LAMP vem atraindo interesse por ser simples, de fácil execução, baixo custo e apresentar elevada sensibilidade e especificidade.

Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi desenvolver sistemas baseados em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas como uma ferramenta rápida, eficaz e que requer poucos investimentos, facilitando sua implementação em áreas de recursos limitados.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

A técnica de amplificação isotérmica em alça (LAMP) se mostra eficaz para o diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda?

## **5 HIPÓTESE**

A técnica de amplificação isotérmica em alça (LAMP) se mostra eficaz para o diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda.

## **6 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver sistemas baseados em amplificação isotérmica em alça (LAMP) para o diagnóstico da doença de Chagas.

### **6.1 Objetivos específicos**

- a) Otimizar sistemas de LAMP convencional e em tempo real para o diagnóstico da doença de Chagas;
- b) Aplicar o sistema de LAMP convencional em amostras de indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas ocorrido em Ibimirim/PE;
- c) Comparar o desempenho do sistema de LAMP com os testes parasitológico e sorológico (padrão-ouro) para o diagnóstico da doença de Chagas;
- d) Comparar o desempenho do sistema de LAMP com o sistema de qPCR (TcSAT-IAM) para o diagnóstico da doença de Chagas;
- e) Desenvolver um kit baseado em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas.

## **7 MATERIAIS E MÉTODOS**

Nesta seção foram descritos os procedimentos e materiais utilizados para a realização do presente estudo.

### **7.1 Desenho de estudo**

Este trabalho caracteriza-se como um estudo analítico de validação de método diagnóstico, onde são avaliados parâmetros como sensibilidade e especificidade do sistema frente a amostras biológicas (SACKETT; HAYNES, 2002).

### **7.2 Amostras de estudo**

Foram utilizadas amostras de sangue de 77 indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas ocorrido em abril de 2019 na cidade de Ibimirim, na mesorregião do sertão Pernambucano. As amostras fazem parte do biorrepositório do Serviço de Referência em Doença de Chagas (SRDC) do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

Dos 77 indivíduos, 38 foram considerados casos de infecção pelo *T. cruzi* e 39 foram considerados não casos, segundo dados da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco (SES/PE). Esta classificação foi baseada em critério clínico-epidemiológico (presença de sinais clínicos de infecção de *T. cruzi*, mas sem exames laboratoriais positivos) ou critério laboratorial (com diagnósticos parasitológico e/ou sorológico positivos para a infecção pelo *T. cruzi*). Dos 38 casos, 10 foram considerados por critério clínico-epidemiológico e 28 por critério laboratorial.

### **7.3 Extração e purificação de DNA das amostras biológicas**

A extração e purificação de DNA das amostras de sangue foram realizadas pela equipe do SRDC utilizando o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Holanda) seguindo as recomendações do fabricante, as quais compreendem basicamente três etapas: lise celular, lavagem da mini coluna e eluição do DNA. O material extraído foi armazenado a -20C° até o momento da utilização.

#### **7.4 Diagnóstico etiológico das amostras biológicas**

O diagnóstico etiológico (parasitológico e sorológico) para confirmação da infecção pelo *T. cruzi* foi realizado pelo SRDC e pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN/PE) conforme o II Consenso Brasileiro em doença de Chagas de 2015 (DIAS *et al.*, 2016).

Para o diagnóstico parasitológico, 62 das 77 amostras de sangue dos indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas foram avaliadas por diferentes técnicas parasitológicas (pesquisa direta a fresco, esfregaço sanguíneo, gota espessa corados e método de strout).

Em relação ao diagnóstico sorológico, 72 das 77 amostras de sangue dos indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas foram avaliadas por testes imunoenzimáticos. O Kit GOLD ELISA (REM Industrias e Comércio LTDA, São Paulo, Brasil) foi utilizado para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM e o kit BIOLISA Chagas Recombinante (QUIBASA Química Básica Ltda, Minas Gerais, Brasil) foi utilizado para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG através de antígenos recombinantes.

#### **7.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)**

O diagnóstico molecular de todos os indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas (n=77) foi realizado através do sistema de qPCR denominado TcSAT-IAM, desenvolvido pelo SRDC.

#### **7.6 Extração e purificação de DNA genômico de *T. cruzi***

A extração e purificação de DNA genômico de *T. cruzi* (cepa Y) foram realizadas utilizando o método de fenol/clorofórmio adaptado de Sambrook *et al.* (1989).

Inicialmente a amostra de tripomastigotas de *T. cruzi* em meio de cultura RPMI foi centrifugada a 12.000 rpm, por 4 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados 800 µL de álcool etílico ao tubo, agitado no vortex e centrifugado a 12.000 rpm, por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e esta etapa foi repetida. Após isso, foram adicionados 400 µL de solução de lise e 20 µL de proteínase K, o tubo foi agitado no vortex e armazenado na estufa a 60 C°, por 1 hora. Posteriormente, foi adicionada solução de fenol na proporção de 1:1, seguida de uma mistura por inversão de tubo e centrifugação a 13.000 rpm,

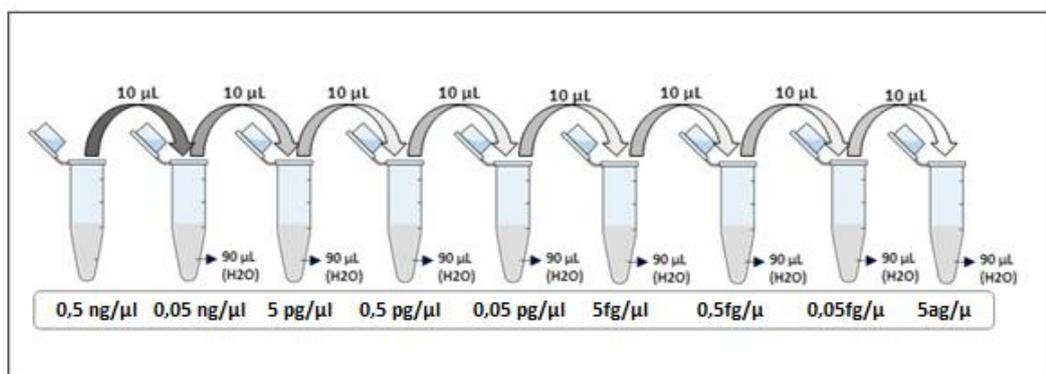
por 3 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionada solução de fenol-clorofórmio, na proporção de 1:1. O tubo foi misturado novamente por inversão e centrifugado a 13.000 rpm por 3 minutos. Após este tempo, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a etapa de fenol-clorofórmio foi repetida. Em seguida, foi adicionada solução de clorofórmio na proporção 1:1, realizada uma mistura por inversão de tubo e centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado álcool isopropílico gelado na proporção 1:1 e armazenado no freezer, por aproximadamente 30 minutos. Após este tempo, foi realizada uma centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o tubo foi deixado em repouso por aproximadamente 15 minutos à temperatura ambiente, para secagem. Por último foi realizada a eluição com 200  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

### 7.7 Curva de diluição seriada de DNA de *T. cruzi*

Após o processo de extração e purificação do DNA genômico de *T. cruzi* (cepa Y), foi realizada a dosagem do DNA através do equipamento Nanodrop 2000c (ThermoScientific), para definir a concentração do DNA extraído.

O DNA foi utilizado para preparação de uma curva de diluição seriada de fator 10, com concentrações entre 0,5 ng/ $\mu\text{L}$  e 5 ag/ $\mu\text{L}$ , para ser utilizada na avaliação da sensibilidade analítica dos sistemas de LAMP (Figura 6). Foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  de cada ponto da curva durante os ensaios.

**Figura 6** – Esquema de preparação da curva de diluição seriada de fator 10 de DNA de *T. cruzi*



Fonte: A autora.

## 7.8 Amplificação isotérmica em alça (LAMP)

Foram otimizados sistemas de LAMP convencional e em tempo real para detecção de DNA de *T. cruzi*. O sistema de LAMP convencional otimizado foi aplicado para o diagnóstico da doença de Chagas em amostras de indivíduos exposto ao surto agudo ocorrido em Ibimirim/PE.

### 7.8.1 Otimização do sistema de LAMP convencional

Foram avaliados dois sistemas de LAMP descritos na literatura: o sistema de Thekiso *et al.* (2010), tendo como alvo molecular o gene 18S rRNA, e o sistema de Ordóñez *et al.* (2020) tendo como alvo uma sequência repetitiva de DNA satélite de 231pb. As sequências dos *primers* de cada estudo estão descritas no Quadro 2.

**Quadro 2** - Sequências dos *primers* utilizados nas reações de LAMP

<b>Autores</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho (pb)</b>
Thekiso <i>et al.</i> (2010)	FIP	CGTGAGTTGAGGGAAGGCATGAGTTGTTGGC AGACTTCGGT	41
	BIP	GCATCCAGGAATGAAGGAGGGTTCGTCTTGG TGCGGTCTA	40
	F3	CCGTGTGGCACTGTTTGT	18
	B3	TGAAGAATGCCTTCGCTGT	19
	LF	CATGTGAGATGCGAAGGG	18
	LB	CATGTGAGATGCGAAGGG	18
Ordóñez <i>et al.</i> (2020)	FIP	CCCACCATTCACAATCGGAAACCACTCGGCT GATCGTTTT	40
	BIP	AGTCAGAGGCACTCTCTGTCAACCAAGCAGC GGATAGTTC	40
	F3	AACTATCCGCTGCTTGG	18
	B3	AAGAGCTCGCGAAATTCC	18
	LF	TTGGACCACAACGTGTGAT	19
	LB	TTCACACACTGGACACCAA	20

**Fonte:** Thekiso *et al.* (2010); Ordóñez *et al.* (2020).

Inicialmente as condições de reação utilizadas para o sistema de Thekiso *et al* foram: 1x Isothermal buffer (New England Biolabs), 6 mM de MgSO<sub>4</sub> (New England Biolabs), 0,8 M de betaína (Sigma-Aldrich), 1,4 mM de cada dNTP (Sigma-Aldrich), 5 pmols de cada *primer* F3 e B3, 40 pmols de cada *primer* FIP e BIP, 20 pmols de cada *primer* LF e LB, 8 U da enzima Bst 3.0 DNA Polymerase (New England Biolabs), 2 µl de DNA de *T. cruzi* e água ultrapura para completar o volume de 25 µl. Os microtubos foram submetidos a temperatura de 63 C° por 60 minuto e para inativação da enzima, ao final da reação, o microtubo foi submetido a 80°C por 10 min.

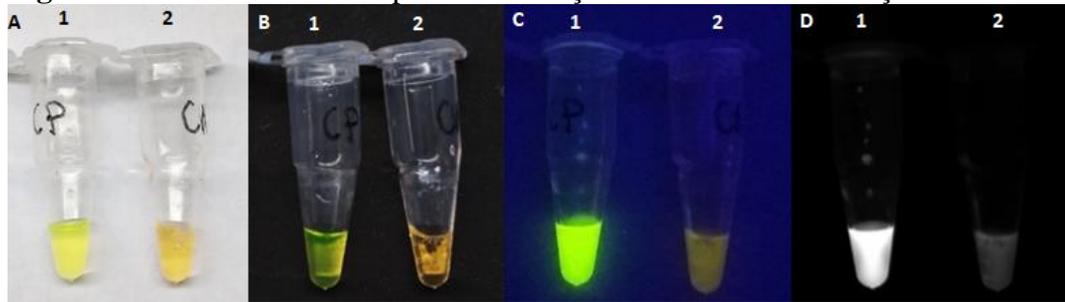
Para o sistema de Ordóñez *et al*, foram utilizadas inicialmente as seguintes condições: 1x Isothermal buffer (New England Biolabs), 0,8 mM de MgSO<sub>4</sub> (New England Biolabs), 1 M de betaína (Sigma-Aldrich), 2,5 mM de dNTP mix (Sigma-Aldrich), 5 pmols de cada *primer* F3 e B3, 40 pmols de cada *primer* FIP e BIP, 5 pmols de cada *primer* LF e LB, 8 U da enzima Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase (New England Biolabs), 2 µl de DNA de *T. cruzi* e água ultrapura para completar o volume de 25 µl. Os microtubos foram submetidos a temperatura de 65 C° por 60 minutos e para inativação da enzima, ao final da reação, o microtubo foi submetido a 80°C por 10 min.

Durante o processo de otimização foram testadas diferentes temperaturas (63-68 C°), tempo de reação (30-90 minutos) e concentração dos reagentes, a fim maximizar a reprodutibilidade do ensaio. O sistema que apresentou resultados preliminares satisfatórios seguiu para fase de avaliação da sensibilidade e especificidade analítica.

### 7.8.2 Análise e registro dos resultados de LAMP

Os resultados das reações de amplificação foram visualizados a olho nu utilizando o corante intercalante de DNA Sybr Green I com observação em iluminação natural (Figura 7A e 7B) e luz ultravioleta (Figura 7C). Foram consideradas positivas aquelas que apresentaram coloração verde e negativas aquelas que apresentaram coloração laranja. Os resultados também foram visualizados utilizando o equipamento iBright FL1500 (Invitrogen), sendo considerados positivos os tubos que apresentaram fluorescência (Figura 7D).

**Figura 7** – Formas utilizadas para visualização do resultado das reações de LAMP



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** A- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (iluminação natural em fundo branco); B- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (iluminação natural em fundo preto); C- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (luz ultravioleta); D - Visualização do resultado da reação de LAMP através do equipamento iBright FL1500 (Invitrogen); 1- Controle positivo (1ng de DNA de *T. cruzi*); 2- Controle negativo.

As reações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose a 2% com coloração pelo brometo de etídio de acordo com Sambrook *et al.* (1989) ou pelo Sybr Safe. As bandas de DNA separadas por eletroforese foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de documentação Polaroid MP4+ System™ (Sigma St. Louis, MA, USA). Foram consideradas positivas aquelas que apresentaram o padrão de bandas em escada característico das reações de LAMP.

### 7.8.3 Otimização do sistema de LAMP em tempo real

O protocolo de LAMP convencional otimizado foi utilizado para o desenvolvimento de um sistema de LAMP em tempo real para o diagnóstico da doença de Chagas. As condições de reação foram: 1x Isothermal buffer (New England Biolabs), 0,8 mM de MgSO<sub>4</sub> (New England Biolabs), 1 M de betaína (Sigma-Aldrich), 2,5 mM de dNTP mix (Sigma-Aldrich), 5 pmols de cada *primer* F3 e B3, 40 pmols de cada *primer* FIP e BIP, 5 pmols de cada *primer* LF e LB, 8 U da enzima Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase (New England Biolabs), 2 µl de DNA de *T. cruzi* e água ultrapura para completar o volume de 25 µl. Os microtubos foram submetidos a temperatura de 65 C° por 60 minutos.

As reações foram realizadas no termociclador Rotor-Gene Q (QIAGEN), sendo utilizado o corante fluorescente Syto 9 para acompanhar o processo de amplificação de DNA em tempo real.

Inicialmente foram realizados experimentos preliminares utilizando 1ng de DNA de *T. cruzi* como controle positivo de reação e o mix sem DNA como controle negativo. Após observada a amplificação de DNA no controle positivo, avaliamos a sensibilidade analítica do sistema.

#### 7.8.4 Avaliação da sensibilidade e especificidade analítica dos sistemas de LAMP

Para avaliação da sensibilidade analítica dos sistemas de LAMP foi utilizada a curva de diluição seriada de DNA genômico de *T. cruzi* descrita no item 7.7. A sensibilidade analítica foi definida pela amplificação da menor diluição do DNA alvo.

Para avaliação da especificidade analítica dos sistemas foi utilizado 1 ng de DNA de alguns microorganismos pertinentes ao estudo como *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, *Sporothrix brasiliensis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Schistosoma mansoni*. A especificidade do sistema foi atestada pela observação da amplificação apenas no tubo contendo o DNA de *Trypanosoma cruzi*.

#### 7.8.5 Aplicação do sistema de LAMP convencional nas amostras de indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas em Ibimirim/PE

O sistema de LAMP convencional otimizado foi aplicado para o diagnóstico da doença de Chagas em amostras de indivíduos expostos ao surto agudo ocorrido em Ibimirim/PE.

Foram realizadas análises comparativas entre os resultados obtidos pelo diagnóstico através do sistema de LAMP e os obtidos no diagnóstico padrão-ouro (parasitológico e sorológico) e através do sistema de qPCR (TcSAT-IAM). Durante as análises foram determinados parâmetro como: sensibilidade, especificidade, valores preditivos, acurácia e indicador de Kappa (k).

#### 7.8.6 Análise comparativa dos custos das técnicas de LAMP convencional e qPCR

Os custos para realização das reações de LAMP convencional e qPCR foram estimados a partir do cálculo do valor dos reagentes utilizados para cada reação, levando em consideração

a cotação realizada em maio de 2021. Foram considerados separadamente os custos com os equipamentos necessários para realização de cada uma das técnicas.

#### 7.8.7 Desenvolvimento de um kit diagnóstico baseado em LAMP

Para o desenvolvimento do kit baseado em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas foram adicionados em um tubo eppendorf de 1,5 ml os seguintes reagentes: isothermal buffer, betaína, sulfeto de magnésio, dNTP mix, *primers* (externos, internos e do loop), enzima Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase e água ultrapura. Em seguida, o mix foi armazenado na geladeira a 8,5 C°.

Também foram adicionados 2 µl do corante Sybr Green I na interface interna da tampa de microtubos e em seguida, estes foram colocados em uma estufa a 60 C° para secagem e fixação do corante. Os microtubos foram armazenados na geladeira juntamente com o mix de reagentes até o momento da utilização.

O kit protótipo é composto por um mix de reagentes, um conjunto de microtubos contendo o corante Sybr Green I fixado na interface interna da tampa do tubo, além do controle positivo de reação (1ng de DNA de *T. cruzi*) (Figura 8), mantidos em geladeira sem a necessidade de congelamento.

**Figura 8** – Desenho esquemático do kit protótipo de LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas



**Fonte:** A autora.

Para utilização do kit, 23,2 µl do mix de reagentes deverá ser transferido para um microtubo juntamente com 2µl de DNA da amostra biológica, sendo posteriormente adicionado em um termociclador ou banho-maria a 65 C° por 60 minutos. Após este intervalo de tempo, deverá ser realizada a inversão do microtubo para que o corante entre em contato com a solução e seja possível observar o resultado da reação a olho nu. As amostras que apresentarem coloração verde serão consideradas positivas, enquanto as que apresentarem coloração laranja serão consideradas negativas. Os resultados deverão ser comparados aos controles positivo e negativo de reação.

O kit foi avaliado mensalmente quanto a estabilidade dos reagentes mantidos no mix em geladeira por dois meses. Foram realizadas reações de LAMP com 1ng, 10pg, 100fg e 10fg de DNA de *T. cruzi*.

### 7.9 Análise estatística

Os resultados foram analisados através de uma tabela de dupla entrada relacionando o diagnóstico padrão da doença e o resultado do teste em avaliação (FERREIRA; ÁVILA, 2001) (Quadro 3).

**Quadro 3** - Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença

Teste	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), onde foram determinados o indicador de Kappa (k) e o valor de *p*. Os resultados foram 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).

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia do teste foram calculados com o auxílio de uma calculadora estatística online (<https://www.openepi.com/DiagnosticTest/DiagnosticTest.htm>).

### **7.10 Considerações éticas**

O presente trabalho utilizou amostras do Biorrepositório do Serviço de Referência em Doença de Chagas, sob responsabilidade da coordenação do SRDC. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz Pernambuco, com CAAE: 07178819.8.0000.5190 (Anexo A).

## 8 RESULTADOS

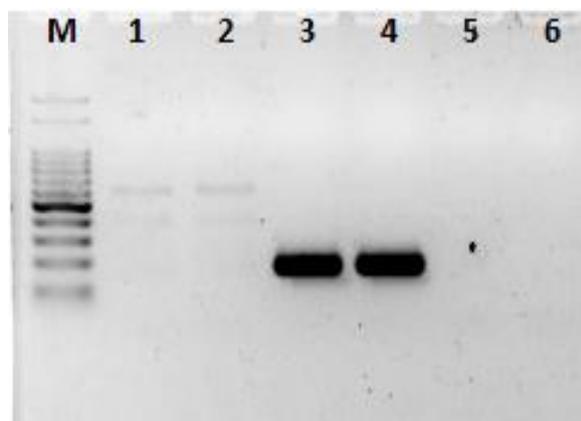
Nesta seção foram apresentados os resultados obtidos no presente estudo.

### 8.1 Otimização do sistema de LAMP convencional para o diagnóstico da doença de Chagas

O sistema de LAMP utilizando os *primers* descritos por Thekiso *et al.* (2010) não apresentou reprodutibilidade durante os ensaios preliminares, mesmo após modificações nas condições de reação (temperatura, tempo de reação, concentração de betaína, adição dos *primers* do loop e substituição da enzima Bst 3.0 DNA Polymerase pela Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase), havendo amplificação constante do controle negativo de reação.

Para avaliar a possibilidade de contaminação cruzada com DNA de *Leishmania infantum*, patógeno de estudo do mesmo laboratório de pesquisa, foi realizada uma PCR convencional utilizando os *primers* externos de Thekiso *et al.* Através da eletroforese dos produtos da PCR foi possível observar amplificação de DNA de *L. infantum* e de *T. cruzi* (Figura 9). Devido à falta de especificidade, o sistema de Thekiso *et al.* foi excluído da pesquisa e não prosseguiu para as etapas seguintes.

**Figura 9** – PCR convencional utilizando os *primers* externos de Thekiso *et al.* (2010)



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** Eletroforese dos produtos de PCR convencional utilizando os *primers* externos de Thekiso *et al.* (2010). M – Marcador molecular (100pb); 1- 1ng de DNA de *L. infantum*; 2- 1ng de DNA de *L. infantum*; 3- 1ng de DNA de *T. cruzi*; 4- 1ng de DNA de *T. cruzi*; 5- Controle negativo (mix de reagentes sem DNA); 6- Controle negativo (mix de reagentes sem DNA).

Já o sistema de LAMP utilizando os *primers* de Ordóñez *et al.* (2020) apresentou reprodutibilidade durante os ensaios e os melhores resultados foram observados com as seguintes condições de reação: 1x Isothermal buffer, 0,8mM de MgSO<sub>4</sub>, 1M de betaína, 2,5mM de dNTP mix, 5 pmols de cada *primer* F3 e B3, 40 pmols de cada *primer* FIP e BIP, 5 pmols de cada *primer* LF e LB, 8U da enzima Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase, temperatura de 65 C° e tempo de reação de 60 minutos. Houve amplificação de DNA de *T. cruzi* nas três concentrações avaliadas (10pg, 1pg e 100fg) (Figura 10).

**Figura 10** - Resultado da reação de LAMP utilizando os *primers* de Ordóñez *et al.* (2020)



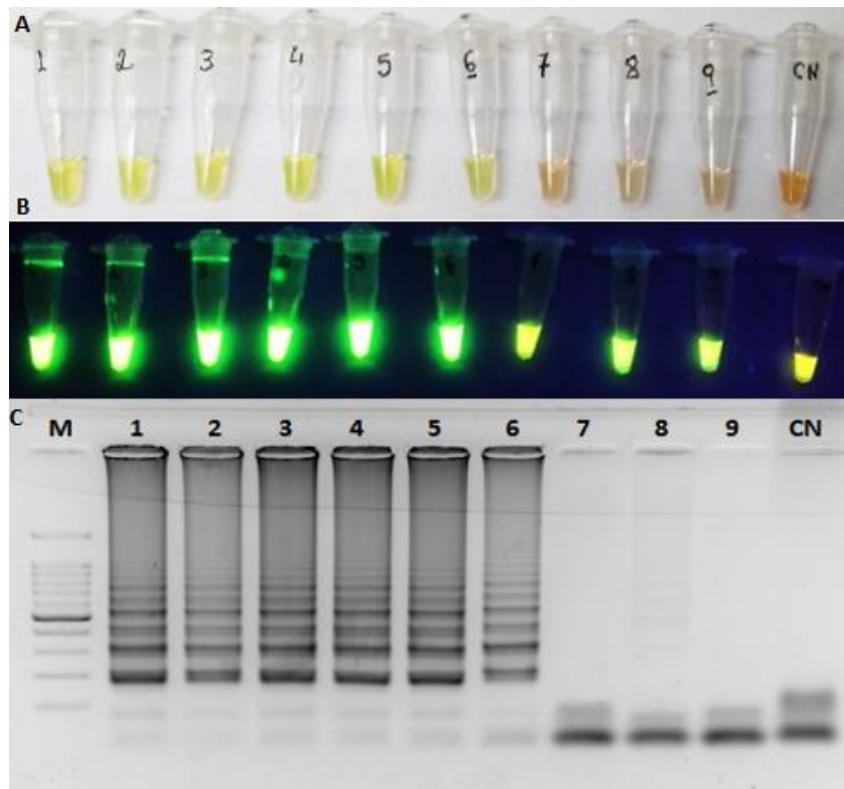
**Fonte:** A autora.

**Legenda:** A- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (iluminação natural); B – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de LAMP. M – Marcador molecular (100pb); 1- 10 pg de DNA de *T. cruzi*; 2- 1 pg de DNA de *T. cruzi*; 3-100 fg de DNA de *T. cruzi*; CN - Controle negativo (mix de reagentes sem DNA).

## 8.2 Sensibilidade analítica do sistema de LAMP convencional

Após otimizado, o sistema de LAMP convencional foi avaliado quanto a sensibilidade analítica. O sistema apresentou um limite de detecção visual de 10 fg, contudo através da eletroforese em gel de agarose foi possível observar uma pequena amplificação de DNA até 100 ag (Figura 11).

**Figura 11** – Resultado do teste de sensibilidade analítica do sistema de LAMP convencional



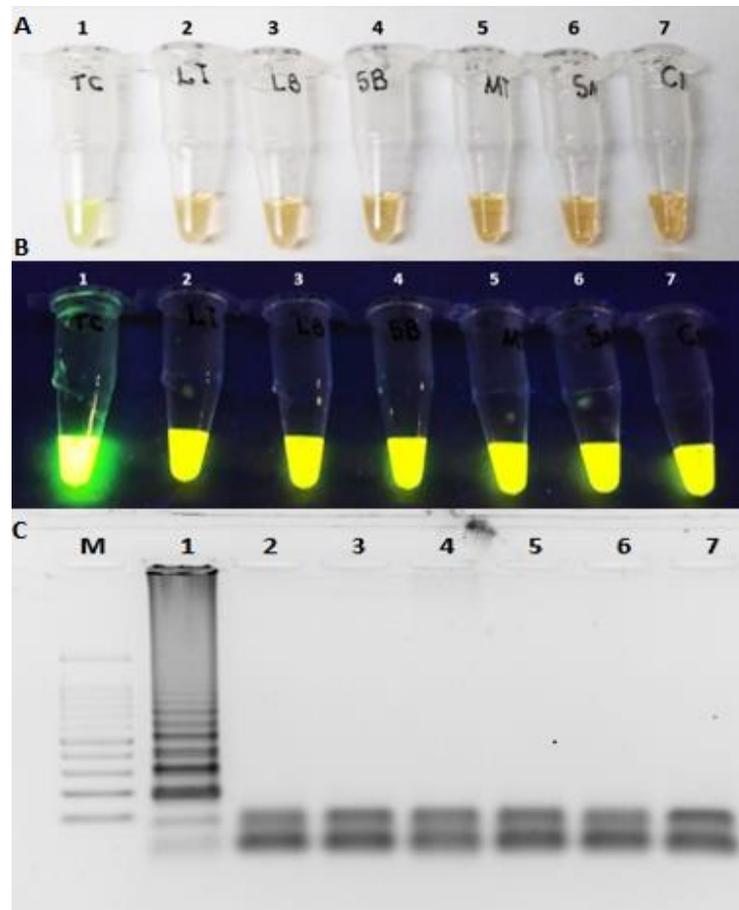
**Fonte:** A autora.

**Legenda:** A- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (iluminação natural); B- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (luz ultravioleta); C- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de LAMP. M – Marcador molecular (100pb); 1- 1 ng; 2- 100 pg; 3- 10 pg; 4- 1 pg; 5- 100 fg; 6- 10 fg; 7- 1 fg; 8- 100 ag; 9- 10 ag; CN- Controle negativo (mix de reagentes sem DNA).

### 8.3 Especificidade analítica do sistema de LAMP convencional

O sistema de LAMP convencional se mostrou específico para o alvo (*Trypanosoma cruzi*), não apresentando amplificação de DNA de nenhum outro microrganismo avaliado (*Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Sporothrix brasiliensis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Schistosoma mansoni*) (Figura 12).

**Figura 12** – Resultado do teste de especificidade analítica do sistema de LAMP convencional



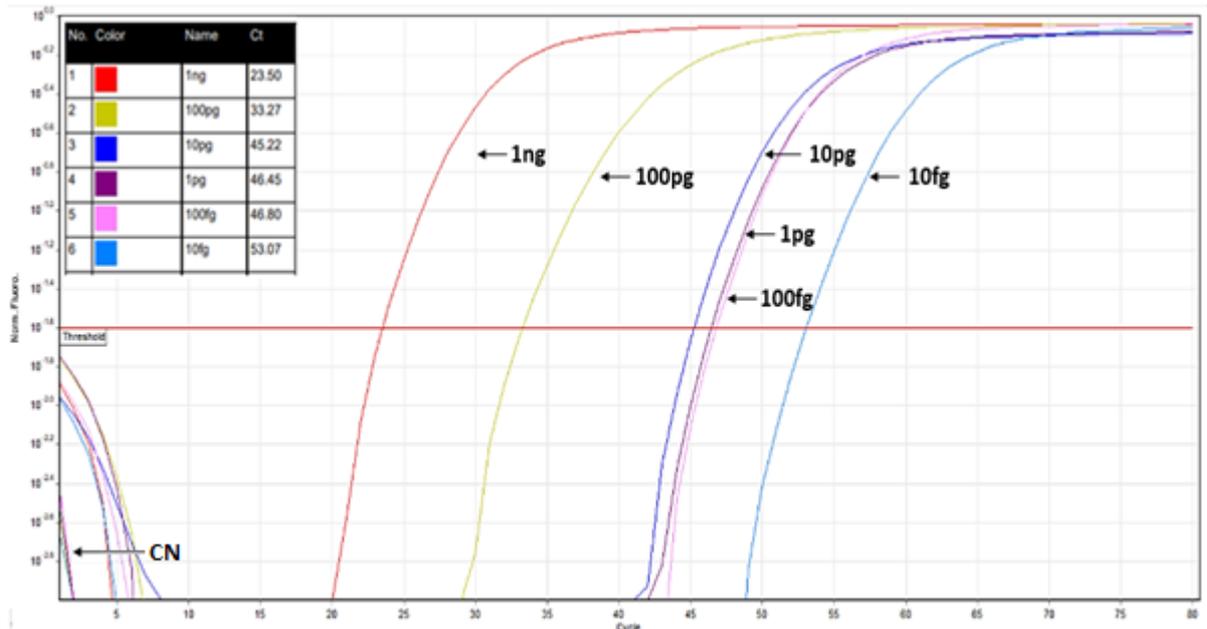
**Fonte:** A autora.

**Legenda:** A- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (iluminação natural); B- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (luz ultravioleta); C- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de LAMP. M – Marcador molecular (100pb); 1- 1 ng de DNA de *T. cruzi*; 2- 1 ng de DNA de *Leishmania infantum*; 3- 1 ng de DNA de *Leishmania braziliensis*; 4- 1 ng de DNA de *Sporothrix brasiliensis*; 5- 1 ng de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*; 6- 1 ng de DNA de *Schistosoma mansoni*; CN- Controle negativo (mix de reagentes sem DNA).

#### 8.4 Otimização do sistema de LAMP em tempo real para o diagnóstico da doença de Chagas

O sistema de LAMP em tempo real amplificou o DNA de *T. cruzi* (1ng) utilizado durante os experimentos preliminares. Na avaliação da sensibilidade analítica, o sistema apresentou um limite de detecção de 10 fg (Figura 13).

**Figura 13** – Resultado do LAMP em tempo real utilizando a curva de diluição seriada de DNA de *T. cruzi*



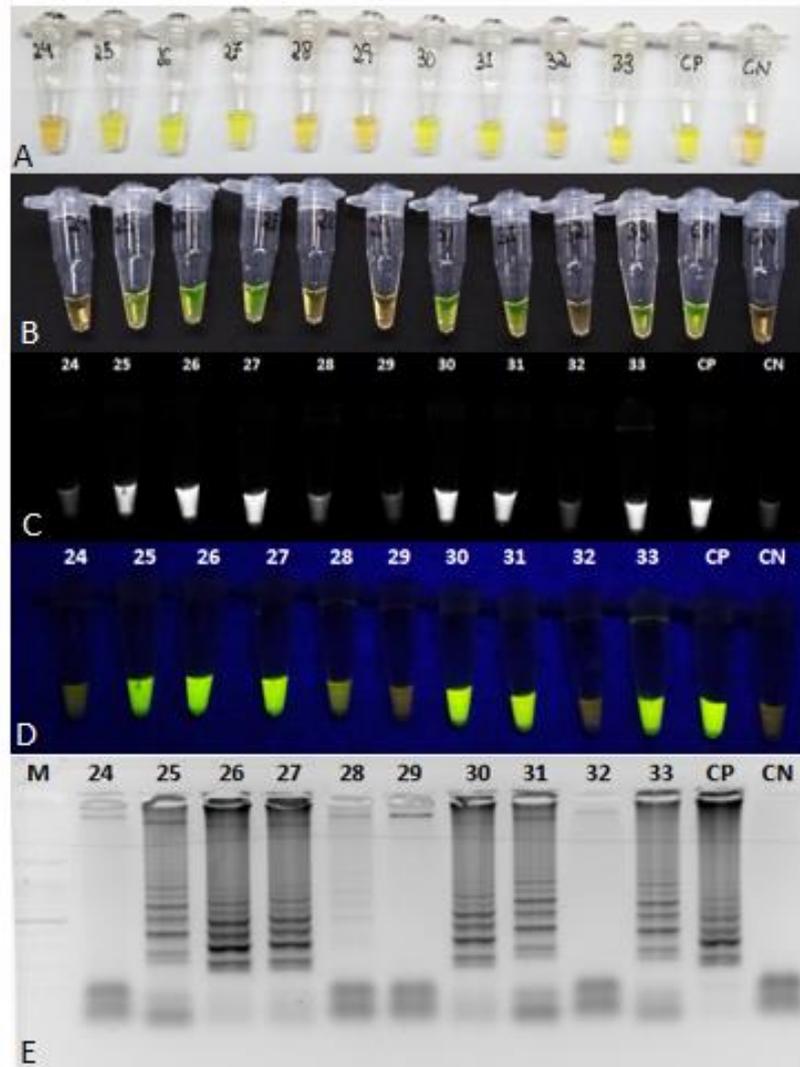
Fonte: A autora.

**Legenda:** Linha vermelha – 1 ng de DNA de *T. cruzi*; Linha amarela – 100 pg de DNA de *T. cruzi*; Linha azul escuro – 10 pg de DNA de *T. cruzi*; Linha roxa – 1 pg de DNA de *T. cruzi*; Linha rosa – 100 fg de DNA de *T. cruzi*; Linha azul claro – 10 fg de DNA de *T. cruzi*; Linha lilás – CN Controle negativo (mix de reagentes sem DNA).

### 8.5 Aplicação do sistema de LAMP convencional nas amostras de indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas em Ibimirim/PE

Após padronização das condições de reação, o sistema de LAMP convencional foi aplicado nas 77 amostras de indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas ocorrido em Ibimirim/PE. Das 77 amostras, 19 foram consideradas positivas e 58 foram consideradas negativas para a doença de Chagas (Figura 14).

**Figura 14** – Resultado do LAMP convencional aplicado nas amostras biológicas



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** A- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (iluminação natural em fundo branco); B- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (iluminação natural em fundo preto); C- Visualização do resultado da reação de LAMP através do equipamento iBright FL1500 (Invitrogen); D- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (luz ultravioleta); E- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de LAMP. M- Marcador molecular (100pb); Amostras 24 a 33; CP- Controle positivo (1ng de DNA de *T.cruzi*); CN- Controle negativo (mix de reagentes sem DNA).

### 8.6 Análise comparativa entre os resultados obtidos pelo sistema de LAMP e os critérios estabelecidos pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco para diagnóstico dos casos

Uma análise comparativa foi realizada relacionando o diagnóstico segundo os critérios da SES/PE e os resultados obtidos pelo sistema de LAMP (Tabela 1).

**Tabela 1** – Análise comparativa entre os resultados pelo sistema de LAMP e os critérios diagnósticos considerados pela SES/PE para definição dos casos

LAMP	Critérios clínico-epidemiológico e laboratorial SES/PE		
	Positivo	Negativo	
<b>Positivo</b>	13	6	19
<b>Negativo</b>	25	33	58
<b>Total</b>	38	39	77
<b>Kappa</b>	<b>0.1895</b>		
<b>Valor de p</b>	<b>0.0277</b>		

Fonte: A autora.

Considerando as amostras de 38 pacientes classificados como casos pela SES/PE, de acordo com critérios clínico-epidemiológico e laboratorial, a sensibilidade do sistema LAMP foi de 34,21%, com intervalo de confiança (IC) inferior 21,21 e superior 50,11 e a especificidade foi de 84,62% (IC inferior 70,27 e superior 92,75); valores preditivos positivo e negativo de 68,42% e 56,9%, respectivamente; acurácia de 59,74% e concordância considerada ruim, segundo Landis e Koch (1977).

Também foi realizada uma análise comparativa considerando apenas os 28 pacientes classificados pela SES/PE de acordo com o critério laboratorial em relação ao diagnóstico pelo sistema de LAMP (Tabela 2).

**Tabela 2** – Análise comparativa entre os resultados do sistema de LAMP e os casos definidos pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco pelo critério laboratorial

<b>LAMP</b>	<b>Critério laboratorial SES/PE</b>		
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
<b>Positivo</b>	11	8	19
<b>Negativo</b>	17	41	58
<b>Total</b>	28	49	77
<b>Kappa</b>	<b>0.2466</b>		
<b>Valor de p</b>	<b>0.0123</b>		

Fonte: A autora.

A sensibilidade do sistema LAMP em relação aos casos definidos apenas pelo critério laboratorial foi de 39,29% (IC inferior 23,57 e superior 57,59) e a especificidade foi de 83,67% (IC inferior 70,96 e superior 91,49); valores preditivos positivo e negativo de 57,89% e 70,69%, respectivamente; acurácia de 67,53% e concordância considerada razoável, segundo Landis e Koch (1977).

Destes 28 pacientes, 11 foram positivos pelo sistema de LAMP, concordando com os resultados dos testes parasitológicos diretos e/ou sorológico.

Quando considerados apenas os resultados das amostras coletadas até 3 dias após implementação do tratamento etiológico para doença de Chagas (n=14) (Tabela 3), 11 apresentaram resultados concordantes com os obtidos pelo diagnóstico através do sistema de LAMP.

**Tabela 3** – Pacientes considerados casos pela SES/PE de acordo com critério laboratorial tratados até 3 dias

(Continua)

<b>Paciente</b>	<b>Carga parasitária (fg/μL) – Momento 0</b>	<b>Tempo de tratamento (dias)</b>
2	8,32 fg	0
3	99,5 fg	2
5	14.346,68 fg	1
6	20,5 fg	2
7	2.975,95 fg	2

**Tabela 3** – Pacientes considerados casos pela SES/PE de acordo com critério laboratorial tratados até 3 dias

(Continuação)

<b>Paciente</b>	<b>Carga parasitária (fg/μL) – Momento 0</b>	<b>Tempo de tratamento (dias)</b>
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.

Considerando os 10 casos classificados pelo critério clínico-epidemiológico, todos os que foram submetidos aos testes sorológicos e/ou parasitológicos apresentaram resultados negativos. Entretanto, quando submetidos ao diagnóstico pelo sistema de LAMP, 2 foram positivos e 8 foram negativos para detecção de DNA de *T. cruzi*.

### **8.7 Análise comparativa entre o sistema de LAMP e o diagnóstico padrão ouro para a doença de Chagas**

Dentre as amostras de sangue de 77 indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas, 62 amostras foram submetidas ao diagnóstico pelo sistema de LAMP e ao diagnóstico pelos métodos parasitológicos diretos, apresentando resultados concordantes em 41 amostras (66,12%) (Tabela 4).

**Tabela 4** – Análise comparativa entre os resultados do sistema de LAMP e o diagnóstico parasitológico para a doença de Chagas

LAMP	Diagnóstico parasitológico		
	Positivo	Negativo	
<b>Positivo</b>	10	8	18
<b>Negativo</b>	13	31	44
<b>Total</b>	23	39	62
<b>Kappa</b>	<b>0.2404</b>		
<b>Valor de p</b>	<b>0.0271</b>		

Fonte: A autora.

Entre os mesmos 77 indivíduos, 72 amostras foram submetidas ao diagnóstico pelo sistema de LAMP e ao diagnóstico sorológico pelo teste imunoenzimático (ELISA), apresentando resultados concordantes em 50 amostras (69,44%) (Tabela 5).

**Tabela 5** – Análise comparativa entre os resultados do sistema de LAMP e o diagnóstico sorológico para a doença de Chagas

LAMP	Diagnóstico sorológico		
	Positivo	Negativo	
<b>Positivo</b>	11	8	19
<b>Negativo</b>	14	39	53
<b>Total</b>	25	47	72
<b>Kappa</b>	<b>0.2858</b>		
<b>Valor de p</b>	<b>0.0067</b>		

Fonte: A autora.

Em relação do diagnóstico parasitológico, o sistema de LAMP apresentou 43,48% de sensibilidade (IC inferior 25,63 e superior 63,19) e 79,49% de especificidade (IC inferior 64,47 e superior 89,22). A acurácia foi de 66,13%, com valores preditivos positivo e negativo de 55,56% e 70,45%, respectivamente. A concordância foi considerada razoável, segundo Landis e Koch (1977).

Em relação do diagnóstico sorológico, o sistema de LAMP apresentou 44% de sensibilidade (IC inferior 26,67 e superior 62,93) e 82,98% de especificidade (IC inferior 69,86 e superior 91,11). A acurácia foi de 69,44%, com valores preditivos positivo e negativo de 57,89% e 73,58%, respectivamente. A concordância foi considerada razoável, segundo Landis e Koch (1977).

### 8.8 Análise comparativa entre o sistema de LAMP e o sistema de qPCR (TcSAT-IAM) para o diagnóstico da doença de Chagas

As amostras de sangue de todos os indivíduos expostos ao surto agudo de doença de Chagas (n=77) foram submetidas ao diagnóstico pelo sistema de LAMP e pelo sistema de qPCR (TcSAT-IAM). Destas, 63 amostras (81,81%) apresentaram resultados concordantes entre os dois sistemas, sendo 14 positivas e 19 negativas. Cinco amostras obtiveram resultado positivo para detecção do DNA de *T. cruzi* apenas pelo sistema de LAMP, enquanto nove amostras obtiveram resultado positivo apenas para o sistema de qPCR (TcSAT-IAM) (Tabela 6).

**Tabela 6** – Análise comparativa entre os resultados do sistema de LAMP e o sistema de qPCR (TcSAT-IAM) para o diagnóstico da doença de Chagas

LAMP	TcSAT-IAM		
	Positivo	Negativo	
Positivo	14	5	19
Negativo	9	49	58
Total	23	54	77
<b>Kappa</b>	<b>0.5432</b>		
<b>Valor de p</b>	<b>&lt; 0.0001</b>		

Fonte: A autora.

A sensibilidade do sistema LAMP em relação ao sistema TcSAT-IAM foi de 60,87% (IC inferior 40,79 e superior 77,84) e a especificidade foi de 90,74% (IC inferior 80,09 e superior 95,98); valores preditivos positivo e negativo de 73,68% e 84,48%, respectivamente; acurácia de 81,82% e concordância considerada moderada, segundo Landis e Koch (1977).

### 8.9 Análise comparativa dos custos das técnicas de LAMP e qPCR.

O custo total por reação de LAMP foi de R\$2,91, já para a qPCR foi em torno de R\$17,56, levando em consideração a cotação de maio de 2021 (Tabela 7).

**Tabela 7** – Análise comparativa dos custos por reação de LAMP em relação a qPCR

LAMP convencional		qPCR	
Reagentes	Custo por reação (R\$)	Reagentes	Custo por reação (R\$)
Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase	R\$0,60	SYBR® Green Master Mix	R\$17,46
<i>Primers</i>	R\$0,20	<i>Primers</i>	R\$0,10
Isothermal Amplification Buffer	R\$0,08	-	-
Sulfato de magnésio	R\$0,005	-	-
Betaína	R\$0,02	-	-
dNTP	R\$1,77	-	-
SYBR® Green I	R\$0,24	-	-
Custo total	R\$2,91	Custo total	R\$17,56

**Fonte:** A autora.

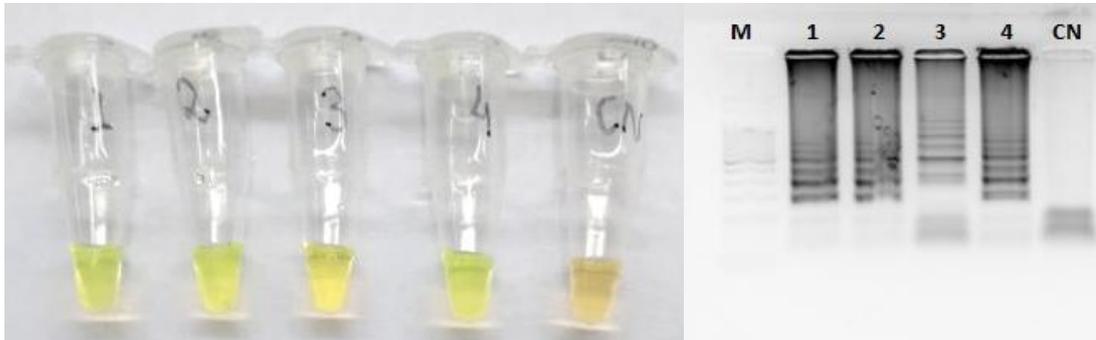
É importante salientar que o preço por reação de LAMP para o sistema utilizado no presente estudo foi ainda maior que o habitual, devido à necessidade do dobro de dNTP utilizado normalmente em reações de LAMP.

Considerando os custos com equipamentos, para o LAMP é necessário apenas um aparelho aquecedor, como por exemplo um termobloco, com custo médio de R\$3.000, enquanto para realização da qPCR é necessário um termociclador para PCR em tempo real com custo entre R\$30.000 e R\$50.000, além de um computador para análise dos dados.

### 8.10 Desenvolvimento de um kit baseado em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas

No primeiro ensaio após um mês de armazenamento do mix de reação em geladeira foi verificado que os reagentes se mantiveram estáveis, havendo amplificação de DNA de *T. cruzi* nas quatro concentrações avaliadas (1ng, 10pg, 100fg e 10fg) (Figura 15).

**Figura 15** – Resultado do primeiro teste de desenvolvimento do kit baseado em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** A- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (iluminação natural); B- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de LAMP. M- Marcador molecular (100pb); 1- 1 ng; 2-10 pg; 3-100 fg; 4-10 fg; CN- Controle negativo (mix de reagentes sem DNA).

No segundo ensaio após dois meses de armazenamento do mix de reação em geladeira também foi verificada a amplificação de DNA de *T. cruzi* nas quatro concentrações avaliadas (1ng, 10pg, 100fg e 10fg) (Figura 16).

**Figura 16** – Resultado do segundo teste de desenvolvimento do kit baseado em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** A- Detecção visual do resultado da reação de LAMP utilizando o corante Sybr Green I (iluminação natural); B- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de LAMP. M- Marcador molecular (100pb); 1- 1 ng; 2-10 pg; 3-100 fg; 4-10 fg; CN- Controle negativo (mix de reagentes sem DNA).

## 9 DISCUSSÃO

No presente estudo desenvolvemos sistemas de LAMP para o diagnóstico de uma das doenças mais negligenciadas, a doença de Chagas. A técnica de LAMP possui diversas vantagens que a tornam ideal para ser utilizada em países endêmicos para a doença: é de fácil execução, possui elevada sensibilidade e que não depende da habilidade do observador (diferentemente das técnicas parasitológicas), é altamente específica devido a utilização de quatro a seis conjuntos de *primers*, diminuindo a chance de reações cruzadas (diferentemente das técnicas sorológicas), além de ser acessível e necessitar equipamentos simples, sendo uma das principais vantagens em relação a outras técnicas moleculares (AVENDAÑO; PATARROYO, 2020; DEA-AYUELA *et al.*, 2018; NJIRU, 2012).

Durante os ensaios iniciais de otimização utilizando o sistema descrito por Thekiso *et al.* (2010) observamos ausência de reprodutibilidade mesmo após modificações nas condições de reação, o que também foi observado por Rivero e colaboradores em testes preliminares utilizando estes *primers* (RIVERO *et al.*, 2017).

Devido a constante amplificação do controle negativo, a possibilidade de contaminação da reação com DNA de *Leishmania sp.*, patógeno de estudo do mesmo laboratório de pesquisa e que possui similaridade genética com o *Trypanosoma cruzi* (GHEDIN *et al.*, 2004) foi investigada. Por ser uma técnica altamente sensível, um dos fatores críticos durante os ensaios de LAMP é o risco de contaminação com amplicons dispersos no ambiente (TOMITA *et al.*, 2008).

Desta forma, ensaios de PCR convencional utilizando os *primers* externos desenvolvidos por Thekiso *et al.* (2010) foram realizados. Como estes *primers* apresentam como alvo a região 18S rRNA, região conservada entre os tripanossomatídeos, é possível que ocorra amplificação de DNA de espécies de *Leishmania sp.* (HERNANDEZ *et al.*, 1993; ULIANA *et al.*, 1991), o que foi confirmado no presente estudo.

A amplificação simultânea de DNA de *Leishmania sp* e de *T. cruzi* utilizando *primers* de LAMP que possuem como alvo o gene 18S rRNA também foi relatada por Rivero *et al.* (2017) utilizando os *primers* desenvolvidos por Mikita (2014), corroborando com os nossos achados.

Em locais endêmicos para doença de Chagas e Leishmaniose, como em Pernambuco (Brasil), esse sistema não deve ser usado como método diagnóstico, podendo apresentar resultados falso positivos. Isto demonstra a importância de testes de avaliação da especificidade durante o desenvolvimento de métodos diagnósticos.

Devido a estes fatores o sistema de Thekiso *et al.* (2010) foi excluído da pesquisa e a otimização do sistema de LAMP prosseguiu utilizando os *primers* descritos por Ordóñez *et al.* (2020). Estes *primers* possuem como alvo uma sequência de DNA satélite repetitiva em tandem, garantindo uma maior sensibilidade devido ao maior número de cópias quando comparado ao 18S rRNA, além de ser mais específico para o alvo (GONZALEZ *et al.*, 1984; REQUENA *et al.*, 1992).

Durante o processo de otimização, modificações no tempo de reação e nas concentrações de dNTP e MgSO<sub>4</sub> foram avaliadas. Contudo os melhores resultados foram observados mantendo o protocolo descrito no artigo de referência (ORDÓÑEZ *et al.*, 2020). Durante os ensaios foi utilizada a enzima Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase que possui maior estabilidade durante a preparação do mix de reação em temperatura ambiente, devido a presença de um aptâmero de ligação reversível que inibe sua atividade em temperaturas abaixo de 45 C° (POOLE *et al.*, 2012). Essa característica pode representar uma importante vantagem na utilização em kits diagnósticos.

A sensibilidade do sistema de LAMP convencional otimizado foi de 10 fg, utilizando a cepa de referência de *T. cruzi* (Cepa Y). O limite de detecção observado por Ordóñez *et al.* (2020) para as cepas CL Brener e Dm28 foi de 5fg e 50fg, respectivamente. Besuschio e colaboradores também desenvolveram *primers* tendo como alvo uma sequência de DNA satélite repetitivo, obtendo a sensibilidade de 0,01fg para as cepas TcI e TcVI (BESUSCHIO *et al.*, 2017). Além das diferentes condições de reação, uma possível explicação para as diferenças de sensibilidade analítica entre os sistemas são as variações moleculares entre as cepas utilizadas, como o tamanho do genoma e o conteúdo de sequências repetitivas (SOUZA *et al.*, 2011).

Em relação a especificidade analítica, Ordóñez *et al.* (2020) utilizaram DNA de diversos parasitas, incluindo *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*, não havendo amplificação de DNA de nenhum deles. Estes resultados corroboram com os nossos achados, demonstrando que o sistema desenvolvido pode ser utilizado em locais endêmicos para Leishmaniose e para Doença de Chagas. Além disso, não houve amplificação de outros patógenos como *S. mansoni*, *M. tuberculosis* e *S. brasiliensis*.

No presente estudo também foi desenvolvido um sistema de LAMP em tempo real para o diagnóstico da doença de Chagas. Durante os ensaios foi utilizado o corante Syto 9 em substituição ao Sybr Green I, pois ele não interfere no processo de amplificação do DNA

podendo ser utilizado para acompanhamento da reação em tempo real (OSCORBIN *et al.*, 2016; QUYEN *et al.*, 2019). A sensibilidade analítica do sistema de LAMP em tempo real foi de 10fg, em concordância com a sensibilidade observada para o sistema de LAMP convencional.

O sistema de LAMP em tempo real representa mais uma alternativa para utilização em locais que já possuam infraestrutura e equipamentos necessários, pois seu custo por reação é menor em relação ao LAMP convencional devido a diferença de valor entre o Syto 9 (R\$0,018) e o Sybr Green I (R\$0,24). Além disso, a utilização do Syto 9 reduz a chance de contaminação da reação por ser aplicado antes do processo de amplificação, diferentemente do Sybr Green I.

O sistema de LAMP convencional foi aplicado em amostras de indivíduos envolvidos em um surto agudo de transmissão oral ocorrido em Pernambuco. Este foi o primeiro surto agudo ocorrido no estado e considerado o maior do país. Outros casos semelhantes foram relatados em Santa Catarina, Paraíba, Amapá, Bahia, Pará, entre outros estados, demonstrando a crescente preocupação com a ocorrência de casos de transmissão oral no Brasil (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015; COURA, 2015; NÓBREGA *et al.*, 2009).

Dos 28 casos considerados pela SES/PE através do critério laboratorial (diagnóstico parasitológico e/ou sorológico positivo), 14 amostras foram obtidas até 3 dias de início do tratamento, destas, 11 foram consideradas positivas pelo sistema de LAMP. Nas 14 amostras restantes não foi possível detectar o DNA de *T. cruzi* através do sistema de LAMP, como também pelo sistema de qPCR, pois estas foram obtidas de 7 a 31 dias após o início do tratamento. O tratamento tripanocida na fase aguda possui uma elevada eficácia, reduzindo significativamente a carga parasitária (BRITTO, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2008), portanto, é de extrema importância para o diagnóstico molecular que a coleta das amostras seja realizada antes do início da terapia anti-parasitária.

Neste estudo, 2 amostras classificadas pelo critério clínico-epidemiológico pela SES/PE obtiveram resultados negativos pelo diagnóstico parasitológico e sorológico, contudo, apresentaram resultado positivo pelo sistema de LAMP em concordância com a presença de manifestações clínicas nos pacientes. Isto pode ser explicado devido a elevada sensibilidade das técnicas moleculares na detecção de DNA de *T. cruzi* (ALONSO-PADILLA *et al.*, 2017; SCHIJMAN, 2018).

Além disso, dos 39 indivíduos negativos pelos critérios de classificação da SES/PE, ou seja, assintomáticos e negativos pelo diagnóstico parasitológico e sorológico, 6 apresentaram

positividade pelo sistema de LAMP. Duas dessas amostras apresentaram resultados concordantes com o diagnóstico pelo sistema de qPCR, enquanto quatro foram positivas apenas pelo sistema de LAMP.

Comparando os resultados apenas do diagnóstico parasitológico em relação ao diagnóstico pelo sistema de LAMP, foi observada que das 23 amostras positivas pelas técnicas parasitológicas, 10 foram positivas pelo LAMP, em concordância com o diagnóstico pelo sistema TcSAT-IAM, enquanto 13 amostras foram negativas pelo LAMP. Contudo, 10 destas já haviam sido coletadas após 13 a 29 dias de tratamento e 2 amostras apresentavam carga parasitária abaixo de 150fg.

Semelhantemente, das 25 amostras positivas pelas técnicas sorológicas, 11 foram positivas pelo LAMP, em concordância com o diagnóstico pelo sistema TcSAT-IAM, enquanto 14 amostras foram negativas pelo LAMP. Contudo, 12 destas já haviam sido coletadas de 7 a 29 dias após o tratamento e 1 amostra apresentou carga parasitária abaixo de 150fg.

Uma amostra apresentou resultado discordante, sendo positiva para o diagnóstico parasitológico, sorológico e pela qPCR, coletada com 3 dias de tratamento e com elevada carga parasitária (2.214,47 fg), porém apresentou resultado negativo no LAMP. Para avaliar a possibilidade de um erro técnico durante o ensaio de LAMP para esta amostra, repetimos o experimento duas vezes, mas os resultados se mantiveram negativos. Uma provável explicação para este resultado seria a possibilidade de degradação de DNA devido ao tempo de armazenamento da amostra.

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a importância da coleta prévia da amostra, em relação ao início do tratamento, para que seja possível garantir uma maior confiabilidade dos resultados. Além disso, é importante salientar que as amostras do presente estudo estavam armazenadas a cerca de dois anos antes da sua utilização nos ensaios de LAMP, e fatores como o tempo de armazenamento ou manipulação de maneira indevida poderiam afetar consideravelmente os resultados, devido a possível degradação do material genético (MELO *et al.*, 2010).

O sistema TcSAT-IAM foi utilizado no diagnóstico molecular das amostras no momento da ocorrência do surto e considerado decisivo para implementação/suspensão do tratamento, tornando-se um sistema validado e por isto também foi considerado como teste padrão para análises comparativas com o sistema de LAMP.

Das 77 amostras submetidas ao diagnóstico pelos dois sistemas, 63 (81,81%) apresentaram resultados concordantes. Cinco amostras foram positivas apenas pelo sistema de LAMP, mas foram negativas tanto pelo sistema TcSAT-IAM como para os testes parasitológico e sorológico. Neste caso, não pode ser descartada a possibilidade de resultados falso-positivos devido a chance de contaminação. Nove amostras obtiveram resultados positivos apenas para o sistema TcSAT-IAM, apresentando carga parasitária abaixo de 150fg ou coletadas com mais de 8 dias do início do tratamento.

Considerando todos estes resultados, o sistema de LAMP apresentou uma concordância considerada moderada em relação ao TcSAT-IAM, segundo Landis e Koch (1977), com sensibilidade, especificidade e acurácia de 60,87%, 90,74% e 81,82%, respectivamente.

Avendaño e Patarroyo (2020) relataram a necessidade da busca por novas ferramentas que possam garantir um diagnóstico precoce da doença de Chagas, enfatizando as principais limitações das técnicas parasitológicas e sorológicas e demonstrando a relevância das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos para este fim. Uma importante alternativa seria a utilização de um “padrão-ouro composto”, ou seja, o uso das técnicas já preconizadas em conjunto com técnicas moleculares, com o objetivo de aumentar a confiabilidade dos resultados.

A técnica de LAMP poderia ser utilizada neste caso, pois demonstrou uma boa concordância com a qPCR, sendo mais facilmente aplicada em locais de recursos limitados, uma vez que o custo para sua realização foi aproximadamente seis vezes menor em relação a qPCR. Além disso, a técnica de LAMP pode ser realizada apenas com um banho-maria, diferente da qPCR que necessita de um laboratório bem equipado com no mínimo um termociclador em tempo real, além de um computador para análise dos dados (GONÇALVES *et al.*, 2014).

Para garantir uma maior aplicabilidade do sistema de LAMP na rotina laboratorial, iniciamos o desenvolvimento de um kit protótipo baseado em LAMP para o diagnóstico da doença de Chagas. Este kit teve como objetivo avaliar a possibilidade de utilização de um mix de reagentes em solução aquosa mantidos em geladeira. Além disso, buscamos reduzir uma das principais limitações da técnica, o elevado risco de contaminação devido a necessidade da abertura do tubo para aplicação do corante de revelação. Para isto, implementamos o corante na interface interna da tampa do tubo e garantimos que este não teria contato com a reação até o momento da inversão do tubo, para que não houvesse interferência no processo de amplificação.

Os resultados preliminares foram satisfatórios, pois foi demonstrado que os reagentes se mantiveram estáveis no mix de reação durante dois meses, mesmo mantidos em geladeira sem haver necessidade de congelamento, sendo uma característica importante para o uso da técnica como point-of-care (POC) a estabilidade dos componentes de reação (DEA-AYUELA *et al.*, 2018). A utilização do corante na tampa do tubo reduziu o risco de contaminação e os resultados da reação foram facilmente visualizados a olho nu após a inversão do tubo. Estudos posteriores deverão ser realizados para prosseguir com a avaliação do kit diagnóstico.

## 10 CONCLUSÕES

- a) O sistema de LAMP convencional se mostrou promissor para o diagnóstico complementar de casos agudos suspeitos de doença de Chagas;
- b) A coleta da amostra após o início do tratamento interferiu nos resultados obtidos pelo sistema de LAMP, devido a redução da carga parasitária, e por isso recomendamos que as amostras direcionadas ao diagnóstico molecular sejam coletadas antes do início do tratamento;
- c) Sugerimos que o sistema de LAMP seja utilizado em conjunto com as técnicas já preconizadas formando um “padrão ouro composto”;
- d) O sistema de LAMP em tempo real desenvolvido no presente estudo representa mais uma alternativa para laboratórios equipados, devido ao maior custo-benefício em relação ao sistema de LAMP convencional;
- e) O kit diagnóstico baseado em LAMP demonstrou potencial para ser implementado na rotina laboratorial, principalmente em locais de recursos limitados.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. M.; EBELL, M. H.; TARLETON, R. L. A Systematic Review of High-Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 6, n. 11, p. 1-9, Nov. 2012.
- ALONSO-PADILLA, J. *et al.* Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. **Expert review of molecular diagnostics**, Londres, v. 17, n. 7, p. 699-710, Jul. 2017.
- ANONYMOUS. Reunião de pesquisa aplicada em doença de Chagas: validade do conceito de forma indeterminada de doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 18, n. 1, p. 46, Mar. 1985
- ARAÚJO, P. F. *et al.* Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 6, p. 437-446, Jun. 2017.
- AVENDAÑO, C; PATARROYO, M. A. Loop-Mediated Isothermal Amplification as Point-of-Care Diagnosis for Neglected Parasitic Infections. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 21, p.7981-8013, Oct. 2020
- BARRET, M. P. *et al.* The trypanosomiasis. **Lancet**, London, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, Nov. 2003.
- BERN, C. Chagas' Disease. **The new england journal of medicine**, Massachusetts, v. 373, n. 5, p. 456-466, Jul. 2015.
- BERN, C. *et al.* Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v.33, n. 1, p. 1-42, Nov. 2019.
- BESUSCHIO, S. A. *et al.* Analytical sensitivity and specificity of a loopmediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. 1-18, Jul. 2017.
- BESUSCHIO, S. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* loop-mediated isothermal amplification (*Trypanosoma cruzi* Loopamp) kit for detection of congenital, acute and Chagas disease reactivation. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v.14, n.8, p. 1-17, Aug. 2020.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 46, n. 21, 2015.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v.50, n.2, 2019

BRASIL, P. E. A. A. *et al.* ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. **BMC infectious diseases**, London, v. 10, n. 337, p. 1-17, Nov. 2010.

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. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 42, n.4, p. 475-478, Oct./Dez. 2013.

BRASIL, P. E. A. A.; CASTRO, R.; CASTRO, L. Commercial enzyme-linked immunosorbent assay versus polymerase chain reaction for the diagnosis of chronic Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 1, p. 1-19, Jan. 2016.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de vigilância em saúde**: volume único. 2. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**: volume único. 3. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2019

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 122-135, Jul. 2009

BUSCAGLIA, C. A; DI-NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and infection**, Paris, v. 5, n. 5, p. 419-427, Jan. 2003.

CABALLERO, Z. C. *et al.* Evaluation of Serological Tests To Identify *Trypanosoma cruzi* Infection in Humans and Determine Cross-Reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, DC, v. 14, n. 8, p. 1045-1049, Aug. 2007

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, Rio de Janeiro, v.10, p.143-169, 1974.

CARDOSO, A. V. N. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 287-289, Out. 2006.

CARRIER Y.; TRUYENS C. Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. (ed.). **American trypanosomiasis Chagas disease**: One hundred years of research. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2017. cap. 23, p. 517-559.

CERISOLA J. A., CHABEN M. F., LAZZARI J. O. Test de hemaglutinação para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Prensa Médica Argentina**, Buenos Aires, v.49, p. 1761-1767, 1962

CHAGAS, C. Processos patogênicos da tripanossomíase americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 5-35, Jan. 1916.

CORASSA, B. R. *et al.* Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. **Perspectiva da saúde pública**, Los Angeles, v. 137, n. 5, p. 289-295, Set. 2017.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 6, p. 641-645, Aug. 2011.

COURA, J.R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n.3, p. 277-282, May. 2015.

CÓRDOVA, E. Neurological manifestations of Chagas' disease. **Neurological research**, New York, v. 32, n. 3, p. 238-244, Apr. 2010.

D'ÁVILA, D. A. 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. 1-16, Nov. 2018.

DEA-AYUELA, M. A. *et al.* Applying Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) in the Diagnosis of Malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiasis as Point-of-Care Tests (POCTs). **Current topics in medicinal chemistry**, Hilversum, v. 18, n. 16, p. 1358-1374, Feb. 2018.

DIAS, J. C. P. Aspectos clínicos, sociais e trabalhistas da doença de Chagas em área endêmica sob controle do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 26, n. 2, p. 93-99, Apr. 1993.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America: A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 603-612, Jul. 2002.

DIAS, J.c. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 49, n. 1, p. 3-60, Dec. 2016.

DUFFY, T. *et al.* Estratégia precisa de PCR em tempo real para monitorar cargas parasitárias da corrente sanguínea em pacientes com doença de Chagas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 3, n. 4, p. 1-11, Apr. 2009.

- FEILIJ, H.; MULLER, L.; CAPPA, S. M. G. Direct Micromethod for Diagnosis of Acute and Congenital Chagas' Disease. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 18, n. 2, p. 327-330, Aug. 1983.
- FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial: avaliação de métodos de diagnósticos das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-imunes. **Guanabara Koogan**; 2 ED. Rio de Janeiro, 2001.
- FIFE, E. H. J; MUSCHEL, H. Fluorescent-Antibody Technic for Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 101, n. 3, p. 540-543, Jan. 1959.
- FLORES-CHAVEZ, M. D. *et al.* Evaluation of the Performance of the Loopamp *Trypanosoma cruzi* Detection Kit for the Diagnosis of Chagas Disease in an Area Where It Is Not Endemic, Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 59, n. 5, p. 1-12, Apr. 2021.
- GALVÃO, L. M. *et al.* Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 87, n. 2, p. 220-223, Mar. 1993.
- GHEDIN, E. *et al.* Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 134, n. 2, p. 183-191, Apr. 2004.
- GONÇALVES, D. S. *et al.* Wolbachia detection in insects through LAMP: loop mediated isothermal amplification. **Parasites & vectors**, London, v. 7, n. 228, May. 2014.
- GONZALEZ, A. *et al.* Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitivity parasite detection assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Atlanta, v. 81, n. 1, p.3356-3360, Jun. 1984.
- GOTO, M. *et al.* Colorimetric detection of loopmediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. **BioTechniques**, London, v. 46, n. 3, p. 167-172, Mar. 2009.
- HABERLAND, A. *et al.* Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, Berlim, v.51, n.2, p. 271-294, Feb. 2013.
- HENRIKSSON, J.; ÅSLUND, L.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, England, v. 12, n. 3, p. 108-114, Jan. 1996.
- HERNANDEZ, R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* ribossomal RNA genes: a review. **Biological Research**, v. 26, n.1-2, p. 109-114, Fev. 1993
- HOWARD, E. J. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. **British journal of obstetrics and gynaecology**, Oxford, v. 121, n. 1, p. 22-33, Jan. 2014.

JAMES, A.; MACDONALD, J. Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics. **Expert review of molecular diagnostics**, Londres, v. 15, n. 11, p. 1475-1489, Jan. 2015.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, Mar. 1977.

LARANJA, F. S. Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. **Circulation**, Dallas, v. 14, n. 6, p. 1035-1060, Jan. 1956.

LI, Y. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. **Microbial pathogenesis**, London, v. 107, n. 1, p. 54-61, Jun. 2017.

LINDER, E. *et al.* Web-Based Virtual Microscopy for Parasitology: A Novel Tool for Education and Quality Assurance. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 10, p. 1-8, Oct. 2008.

LIU, W. *et al.* Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loopmediated isothermal amplification assay. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 40125, p. 1-9, Jan. 2017.

LUQUETTI, A. O.; CASTRO, A. M. Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. *In*: DIAS J. C. P.; COURA, J. R. (ed.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997, p. 99-113.

LUQUETTI A. O., RASSI A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *In*: BRENER Z., ANDRADE Z., BARRAL-NETTO M (ed.). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p. 344-78.

LUQUETTI A. O, SCHMUÑIS G. A. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *In*: TELLERIA J., TIBAYRENC M. (ed.). **American Trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research**. Amsterdam: Elsevier, 2010, p. 743-92.

MARCIPAR, I.; LAGIER, C. Advances in Serological Diagnosis of Chagas 'Disease by Using Recombinant Proteins. **Current Topics in Tropical Medicine**, Rijeka, p. 273 – 298, Mar. 2012.

MADY, C.; NACRUTH, R. Natural history of chronic Chagas' heart disease: prognosis factors. **Sao Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 113, n. 2, p. 791-796, Apr. 1995.

MARTINS-MELO, F. R.M. *et al.* Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v.130, p.167-174, Fev. 2014.

MATOS, H. J. *et al.* Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 6, n. 1, p. 65-68, Mar. 2015.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics**, São Paulo, v. 64, n. 12, p. 1219-1224, Jan. 2009.

MEIS J., CASTRO R. S. S. **Manual para o diagnóstico em doença de Chagas: para microscopistas de base no estado do Pará**. 1. ed. Rio de Janeiro, 2017

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

MESSENGER, L. A. *et al.* Towards improving early diagnosis of congenital Chagas disease in an endemic setting. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 65, n. 2, p. 268-275, Jul. 2017.

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**, Oxford, v. 71, n. 3, p. 217-225, Jan. 1977.

MILES, M. A. *et al.* Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, London, v. 272, n. 5656, p. 819-821, Jan. 1978.

MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M.m. O controle da transmissão transfusional. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 2, p. 64-67, Jan. 2011.

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**, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 23-31, Jan. 2013.

MORI, Y. *et al.* Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 289, n. 1, p. 150-154, Nov. 2001.

MORI, Y.; KANDA, H.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. **Journal of infection and chemotherapy**, Tokyo, v. 19, n. 3, p. 404-411, Jun. 2013.

MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **Journal of infection and chemotherapy**, Tokyo, v. 15, n. 2, p. 62-69, Apr. 2009.

MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage. **Journal of infection and chemotherapy**, Tokyo, v. 26, n. 1, p. 13-17, Jan. 2020.

- MUÑOZ, M. J; MURCIA, L; SEGOVIA, M. The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 9, n.1, p. 5-7, Jan. 2011.
- MYLER, P. J. Molecular variation in trypanosomes. **Acta tropica**, Basel, v. 53, n. 3, p. 205-225, Jan. 1993.
- NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 16, n. 3, p. 223-229, Jun. 2002.
- NJIRU, Z. K. Loop-Mediated Isothermal Amplification Technology: Towards Point of Care Diagnostics. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. 1-4, Jun. 2012.
- NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, London, v. 28, n. 12, p. 1-7, Jun. 2000.
- NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. **Journal of microbiology**, Seoul, v. 53, n. 1, p. 1-5, Jan. 2015.
- NÓBREGA, A. A. *et al.* Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açai Palm Fruit, Brazil. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 15, n. 4, p. 653-655, Apr. 2009.
- OLIVEIRA, M. F. *et al.* Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v.37, n. 3, p. 209-228, Jul-Sep. 2008.
- OLIVEIRA, C. N. C. **Aplicação do diagnóstico molecular para caracterização dos pacientes envolvidos no surto de doença de Chagas em Pernambuco.** Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife. 2020
- ORDÓÑEZ, D. *et al.* A *Trypanosoma cruzi* Genome Tandem Repetitive Satellite DNA Sequence as a Molecular Marker for a LAMP Assay for Diagnosing Chagas' Disease. **Disease Markers**, Chichester, v. 2020, n. 8074314, p. 1-8, Feb. 2020.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee.** Geneva: WHO, 2002. (World Health Organization technical report series, v. 905).
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases.** Geneva: WHO, 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly epidemiological record**, Geneva, v. 6, n. 90, p. 33-44, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Doença de Chagas (tripanosomíase americana)**. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 14 out. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Distribuição global dos casos de doença de Chagas, com base em estimativas oficiais, 2018**. Disponível em: [https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2). Acesso em: 2 dez. 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Chagas disease**. Disponível em: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=pt](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=pt). Acesso em: 18 oct. 2019.

OSCORBIN, I. P. *et al.* Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). **BioTechniques**, London, v. 61, n. 1, p. 20-25, Jun. 2016.

PARIDA, M. *et al.* Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique: perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in medical virology**, Chichester, v. 18, n. 6, p. 407-421, Nov. 2008.

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 31, n. 11, p. 595-603, Nov. 2015.

PÉREZ-MOLINA J. A., *et al.* Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v.64, n.6, p. 1139-1147, Dec. 2009.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, London, v. 391, n. 10115, p. 82-94, Jan. 2018.

PICADO, A. *et al.* The burden of congenital Chagas disease and implementation of molecular diagnostic tools in Latin America. **BMJ Global Health**, London, v. 3, n. 1, p. 1-7, Feb. 2018.

PIRON, M. *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 195-200, Set. 2007.

POOLE C. B. *et al.* Diagnosis of brugian filariasis by loop-mediated isothermal amplification. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.6, n. 12, p. 1-9, Dec. 2012.

PORRÁS, A. I. *et al.* Target Product Profile (TPP) for Chagas Disease Point-of-Care Diagnosis and Assessment of Response to Treatment. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. 1-8, Jun. 2015.

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

QUYEN, T. L. *et al.* Classification of Multiple DNA Dyes Based on Inhibition Effects on Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Prospect for Point of Care Setting. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v.10, n.1, p.2234, Oct. 2019

RAMÍREZ, J. C. *et al.* First external quality assurance program for bloodstream Real-Time PCR monitoring of treatment response in clinical trials of Chagas disease. **PloS one**, San Francisco, v. 12, n. 11, p. 1-15, Nov. 2017.

RASSI Jr, A. R.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, London, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr. 2010.

RASSI Jr, A. R.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 275-291, Jun. 2012.

REQUENA, J. M. *et al.* Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p.271-280, May. 1992.

REQUENA-MÉNDEZ, A. *et al.* Prevalence of Chagas Disease in Latin American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 1-15, Feb. 2015.

RIOS, A. *et al.* Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 1, p. 3-8, Jan. 2018.

RIVERO, R. *et al.* Rapid detection of *Trypanosoma cruzi* by colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A potential novel tool for the detection of congenital Chagas infection. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 89, n. 1, p. 26-28, Sep. 2017.

SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. The architecture of diagnostic research. **British Medical Journal**, London, v. 324, n. 7336 p. 539-541, Mar. 2002.

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**, Uberaba, v. 51, n. 3, p. 310-317, Jun. 2018.

SCHIJMAN, A. G. *et al.* International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 1, p. 1, Jan. 2011.

SCHIJMAN, A. G. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 184, n. 1-13, p. 59-66, Aug. 2018.

SOUZA, S. L.; CAMARGO, M. E. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American Trypanosomiasis serodiagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 8, n. 6, p. 255-258, Nov. 1966.

SOUZA, W. *et al.* Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 8, n. 4, p. 269-285, Feb. 2002.

SOUZA, R. T *et al.* Genome Size, Karyotype Polymorphism and Chromosomal Evolution in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, San Francisco, v.6, n.8, p. 1-14, Aug. 2011

STURM, N. R. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 205-214, Mar. 1989.

TANNER, N. A.; EVANS, T. C. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *In*: AUSUBEL, F. M. (ed.). **Current protocols in molecular biology**. New York: Current Protocols in Molecular, 2014, p. 15.14.1-15.14.14

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

THEKISOE, O. M. *et al.* Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 182-189, Jun. 2007.

THEKISOE, O. M. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* Infections from *Rhodnius pallescens* Bugs by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 82, n. 5, p. 855-860, May. 2010.

TOMITA, N. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature protocols**, London, v. 3, n. 5, p. 877-882, Jan. 2008.

TOMLINSON, J. In-Field Diagnostics Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Methods in molecular biology**, Clifton, v. 938, n. 1, p. 291-300, Jan. 2013.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International journal for parasitology**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 472-481, Jan. 2001.

ULIANA, S. R. B. *et al.* Leishmania: Genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence, **Experimental Parasitology**, New York, v.72, n. 2, p. 157-163, Feb. 1991.

VELÁZQUEZ, E. B. *et al.* Predictive role of polymerase chain reaction in the early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 137, n. 1, p. 195-200, Sep. 2014.

VIRREIRA, M. *et al.* Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 68, n. 5, p. 574-582, mai./2003.

VOLLER, A. *et al.* Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for chagas' disease. **The Lancet**, London, v. 305, n. 7904, p. 426-428, Feb. 1975.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: Theory and practice. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 53, n. 1, p. 55-65, Jan. 1976.

VOLTA, B. J. *et al.* Some Limitations for Early Diagnosis of Congenital Chagas Infection by PCR. **Pediatrics**, Springfield, v. 141, n. 5, p. 451-455, Apr. 2018.

ZHANG, X. *et al.* Monitoring the progression of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) using conductivity. **Analytical biochemistry**, Orlando, v. 466, n. 1, p. 16-18, Dec. 2014.

ZHANG, X.; LOWE, S. B.; GOODING, J. J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Biosensors & bioelectronics**, Oxford, v. 61, n. 1, p. 491-499, Nov. 2014.

ZHAO, Y. *et al.* Isothermal Amplification of Nucleic Acids. **Chemical Reviews**, Easton, v. 115, n. 22, p. 12491-12545, Nov. 2015.

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

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 240-253, Mar. 2012.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta tropica**, Amsterdam, v. 184, n. 1, p. 38-52, Aug. 2018.

## ANEXO A – PARECER DO CEP



**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

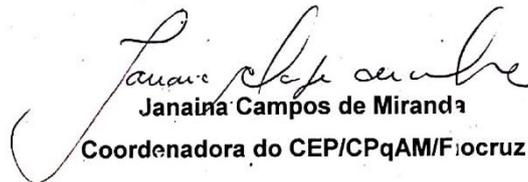
**Número do Parecer na Plataforma Brasil:** 3.215.757

## 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

