



MEDTROP 2010

mudanças ambientais e as doenças tropicais: desafios do milênio
XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Certificamos que

ALEJANDRO MARCEL HASSLOCHER MORENO

participou do **XLVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL**,
realizado de 14 a 18 de Março de 2010, em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil
Com carga horária total de 36 horas

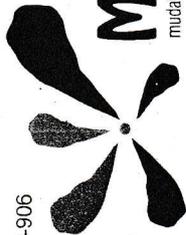
Foz do Iguaçu, 18 de Março de 2010.

Flávio de Queiroz Telles Filho
Presidente do XLVI Congresso



Maria Aparecida Shikanai Yassuda
Presidente da SBMT

CERTIFICADO



MEDTROP 2010

mudanças ambientais e as doenças tropicais: desafios do milênio
 XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Certificamos que

**PEDRO EMMANUEL ALVARENGA AMERICANO DO BRASIL; LIANE DE CASTRO;
 ALEJANDRO MARCEL HASSLOCHER MORENO; INGEBOURG GEORG; ANDRE LUIZ
 JEOVANIA DA SILVA**

participou do **XLVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL**,
 realizado de 14 a 18 de Março de 2010, em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil

na qualidade de autores do Poster: IMPLEMENTATION OF T.CRUZI PCR FOR CHRONIC
 CHAGAS DISEASE IN CLINICAL ROUTINE: INITIAL COMPARISON OF DIFFERENT
 PROTOCOLS.

Foz do Iguaçu, 18 de Março de 2010.

Flávio de Queiroz Telles Filho
 Presidente do XLVI Congresso



Maria Aparecida Shikanai Yassuda
 Presidente da SBMT.

C E R T I F I C A D O

IMPLEMENTAÇÃO DE REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA PARA *T. cruzi* PARA DIAGNOSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS CRONICA EM ROTINA CLÍNICA: COMPARAÇÃO INICIAL DE DIFERENTES PROTOCOLOS

Pedro Emmanuel Alvarenga Americano do Brasil¹; Liane de Castro²; Alejandro Marcel Hasslocher-Moreno; Ingebourg Georg³; André LJ Jeovânio-Silva².

Instituição: Laboratório de Pesquisa Clínica em Doença de Chagas¹ e Laboratório Biomarcadores e Hepatotoxicidade² Fiocruz- Laboratório de Patologia Clínica³ - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
 Endereço: Avenida Brasil, 4365, Manguinhos- Rio de Janeiro - RJ.
 e.mail: pedro.brasil@ipec.fiocruz.br

INTRODUÇÃO

Para confirmação da suspeita clínica da doença de Chagas, dois métodos diferentes de técnicas sorológicas devem ser aplicadas simultaneamente. Em caso de desacordo entre os dois testes sorológicos em duas amostras consecutivas, um teste para confirmação molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) é aconselhável. A PCR demonstra uma sensibilidade analítica maior comparada ao xenodiagnóstico e a hemocultura.

Diferentes protocolos que visam a identificar a presença do K-DNA do *T. cruzi* tem sido avaliados para confirmar a presença de infecção nos pacientes com diagnóstico indeterminado. Os Minicírculos do cinetoplasto representam um alvo para a PCR, uma vez que estão presentes em um número elevado de cópias na rede de DNA mitocondrial. Além disso, cada molécula de K-DNA contém quatro regiões conservadas que podem servir de alvo para a amplificação. Entretanto, o uso da PCR como método diagnóstico para doença de Chagas não apresenta um protocolo estabelecido e, portanto, necessita de avaliações em cenários clínicos.

OBJETIVO

Avaliar protocolos de PCR, utilizando seqüências de oligonucleotídeo disponível na literatura científica indicados para detecção do K-DNA do *T. cruzi*, para o diagnóstico de Doença de Chagas.

METODOLOGIA

Esta investigação foi realizada no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro de Chagas (IPEC - FIOCRUZ), no período de Maio a Novembro de 2008. Sessenta pacientes foram selecionados a partir de uma seqüência de indivíduos atendidos no IPEC com suspeita de doença de Chagas crônica, utilizando-se dois testes sorológicos simultâneos como referência para o diagnóstico. Foram selecionados os primeiros 30 doentes nesse período e sorteados aleatoriamente 30 não doentes do mesmo período.

Dos sessenta pacientes selecionados (30 com sorologia positiva e 30 com sorologia negativa), foram realizadas três coletas em intervalos de aproximadamente uma semana. Em cada coleta eram obtidas duas alíquotas de 5mL de sangue em tubos contendo EDTA. Em uma das alíquotas acrescentou-se Guanidina 6M na proporção de 50%.(v/v). A outra alíquota foi diretamente armazenada em EDTA a -20°C. O DNA foi obtido a partir de 200uL do sangue total, utilizando-se kit comercial (Qiagen) e submetidos ao protocolo de PCR estabelecido utilizando os oligonucleotídeos "121" e "122" para a amplificação da região hipervariada do K-DNA (fig.1). A figura 2 mostra os amplicons da região alvo com aproximadamente 330 pares de bases. Para diferentes combinações de resultados das amostras seriadas foram estimadas as sensibilidades e especificidades da PCR para ambos os protocolos. A especificidade é a fração dos que obtiveram resposta negativa no teste entre aqueles que não possuem a doença, enquanto a sensibilidade é a fração dos que obtiveram resposta positiva no teste entre aqueles que possuem a doença.

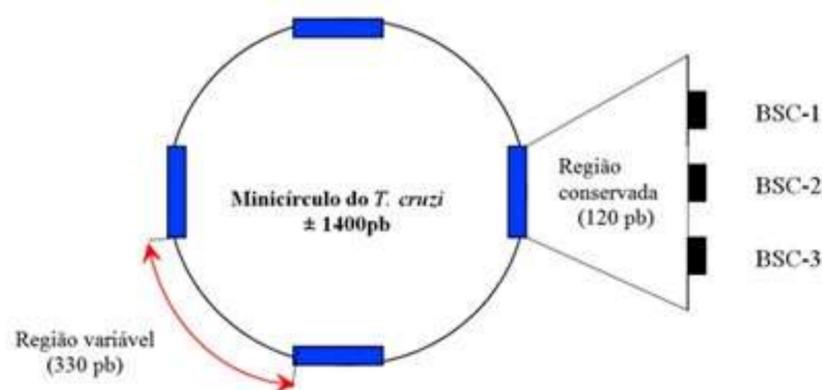


Fig.1: Modelo esquemático da estrutura molecular do minicírculo do K-DNA do *T. cruzi*.

Os blocos em azul representam as regiões conservadas (Locais de hibridização dos oligonucleotídeos "121" e "122"). Baseado nessa informação, esperamos amplicons com aproximadamente 330 pares de bases.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

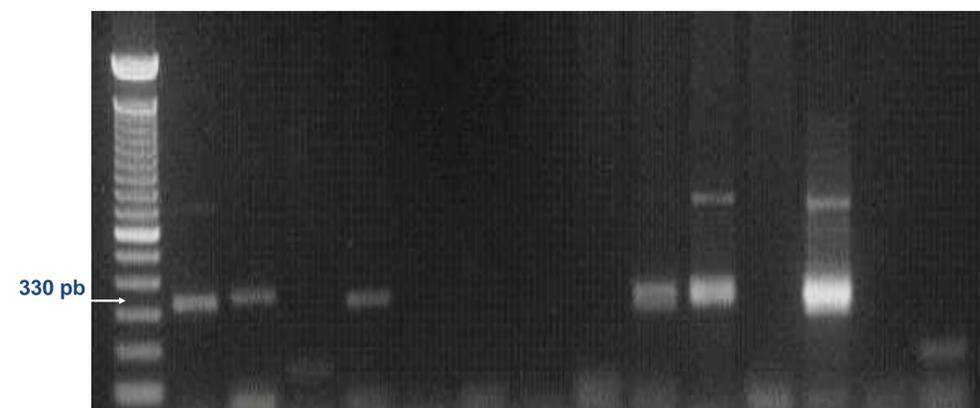


Fig 2: Amplificação da seqüência do K-DNA de *T. cruzi*. Linha 1, 100pb (marcador de peso molecular); linha 2 -12, Produtos de PCR das amostras dos pacientes; linha 13 - controle positivo (DNA de amostra de paciente com diagnóstico confirmado de Doença de Chagas Crônico; linha14, controle negativo (DNA genômico de paciente negativo para o diagnóstico de Doença de Chagas); linha 15, controle de mix da PCR.

RESULTADOS

O protocolo utilizado revelou uma tendência à baixa acurácia. A metodologia aplicada demonstrou uma maior sensibilidade entre as amostras armazenadas em guanidina (92%) e maior especificidade entre as amostras armazenadas em EDTA (96%), quando analisadas em série. No entanto, analisando-se os resultados de PCR das amostras isoladamente, ou seja, como aquela amostra como a única disponível, a sensibilidade e especificidade parecem ser melhores em amostras armazenadas em EDTA. A melhor sensibilidade e especificidade foram: 70% e 73% respectivamente, em amostras em EDTA, enquanto as amostras armazenadas em guanidina, submetidas ao mesmo protocolo, apresentaram sensibilidade e especificidade de 61% e 50% respectivamente.

Tabela 1: Estimativas de sensibilidade e especificidade para os dois protocolos de conservação das amostras no diagnóstico de doença de Chagas crônica por PCR considerando diferentes interpretações entre "em série" ou "em paralelo"; onde cada paciente teve três amostras coletadas e de uma (qualquer) a todas três amostras deveria evidenciar amplificação para se considerar o voluntário doente.

Detecção de K-DNA	EDTA		GUANIDINA + EDTA	
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
Em 1 amostra	70 %	73 %	92 %	0 %
Em 2 amostras	36 %	90 %	84 %	14 %
Em 3 amostras	13 %	96 %	61 %	50 %

DISCUSSÃO

Quando utilizada uma única amostra dos pacientes, o protocolo de PCR realizada com os oligonucleotídeos escolhidos não demonstrou performance desejada para o diagnóstico de doença de Chagas crônica utilizando-se como teste de referência a sorologia. De forma ordinária, para a rotina clínica, ambos os protocolos não demonstram ser uma boa ferramenta para a confirmação do diagnóstico. Desse modo, esse teste ainda não deve ser implementado para uso na rotina do diagnóstico de pacientes com suspeita de doença de Chagas Crônica com resultados sorológicos inconclusivos.

Entretanto a utilização de novas estratégias, incluindo o teste de outros oligonucleotídeos, outras regiões alvo de amplificação, novos métodos de obtenção do DNA do *T. cruzi*, entre outros protocolos alternativos bem como a utilização de diferentes kits de extração, coleta e/ou extração de diferentes volumes, poderia contribuir para o aprimoramento do teste tornando-o aplicável para a confirmação do diagnóstico de doença de Chagas crônica. Ainda, estudar a performance do PCR em um maior número de amostras de voluntários permitirá maior precisão e melhor interpretação dos resultados.