

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

POLIANA ALVES DE SOUZA GODOI

PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA *REAL TIME* PCR COMO
FERRAMENTA DE DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM AMOSTRAS DE
SANGUE E ALIMENTOS

CURITIBA

2015

POLIANA ALVES DE SOUZA GODOI

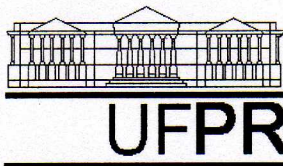
PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA *REAL TIME* PCR COMO
FERRAMENTA DE DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM AMOSTRAS DE
SANGUE E ALIMENTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2015



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos trinta dias do mês de janeiro de 2015, na Sala de Aulas do PPGEBB do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof. Dr. Júlio César de Carvalho, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Nonagésima Terceira Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Prof. Dr. Rogério Saad Vaz (FPP), Prof. Dr. Rogério Luiz Kopp (UFPR), Profa. Dra. Michelle Zibetti Tadra Sfeir (UFPR), e Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol (UFPR – orientadora da dissertação).

Às 09h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Poliana Alves de Souza Godoi** a fazer a apresentação da dissertação intitulada: **“PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE REAL TIME PCR COMO FERRAMENTA DE DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM AMOSTRAS DE SANGUE E ALIMENTOS”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Prof. Dr. Rogério Saad Vaz, Prof. Dr. Rogério Luiz Kopp, Profa. Dra. Michelle Zibetti Tadra Sfeir, e Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol, declarou a candidata aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 30 de janeiro de 2015.



Prof. Dr. Rogério Saad Vaz



Prof. Dr. Rogério Luiz Kopp



Profa. Dra. Michelle Zibetti Tadra Sfeir



Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol

DEDICATÓRIA

A Deus, pela força da minha fé, ao meu esposo Erik Godoi, pelo apoio incondicional, perseverança, compreensão nos momentos de ausência e total dedicação em toda a caminhada, a quem dedico essa conquista assim como todo meu amor;

*A minha família, irmãos (Dionízio, Aline e Rafa), Ana e Luis, afilhados (Jhemes, Gustavo, Ana Beatriz, Laura e Felipe), e em especial meu **pai**, minha **mãe**, por serem a minha paz, o meu chão, o meu aconchego e a minha vida.*

Ao meu querido avô Dionízio Ribeiro de Souza (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conduzir em cada passo dessa jornada, fortalecendo a minha fé e ouvindo minhas preces, pela simples mas maravilhosa oportunidade de estar viva, pelo discernimento, e por todas as pessoas extremamente importantes que colocou em meu caminho, dentre as quais destacarei nesta oportunidade:

À minha amada família, que sempre com pouco recurso me incentivou a lutar com muito amor, simplicidade e integridade. À Ana Maria Taveira de Godoi Santos, Luis Augusto dos Santos, Aline Godoi, Gustavo Godoi e Rafael Poeck. Obrigado pelas palavras de incentivo e encorajamento. Pela incasável missão de me levar à Brasília e me fazer retornar em paz. Pelo afeto e compreensão à mim dispensado;

Aos meus pais, Dislei Ribeiro de Souza e Maria Lúcia Alves França de Souza, que sempre se privaram do melhor para que eu o tivesse, por todo afago quando eu mais precisei, toda compreensão nos finais de semana em que me ausentava e pelo amor incondicional. Tudo que sou e que tenho eu devo a vocês. Obrigado por tudo!;

Ao meu querido irmão pelos momentos de alegrias e incentivo, mesmo longe soube compartilhar palavras certas de motivação quando estava abatida, você sempre... sempre será um exemplo para mim;

Agradeço especialmente ao meu amado esposo, Erik de Godoi Santos Souza, pelo incontestável companheirismo, apoio, compreensão, dedicação e amor a mim dispensado desde o momento em que nossos corações se uniram. Sua presença foi fundamental para que eu pudesse me manter forte e perseverante nesse desafio que nos propomos a cumprir.

À minha família de Curitiba, Marlen Salete, Luciana Maira, Mariana Batista, Fernando Deddos e Gustavo Leites, que me acolheram com carinho, dedicação, cuidado, amor... Vocês são meu pote de ouro no final do arco íris. Sem vocês os meus dias em uma cidade desconhecida seriam muito árdusos e difíceis. Obrigado por tornarem tudo mais leve;

À minha orientadora Dr^a Vanete Thomaz Soccol, pela calorosa recepção, pela confiança apenas no olhar de uma pessoa que clamava pelo saber e que adotou e tomou para si o desafio da formação humana e profissional, a dedicação e conhecimentos científicos transmitidos ao longo desse tempo. Admiro sua pessoa e me orgulho de ter convivido esses anos ao seu lado, e certamente sua contribuição na Pesquisa e Ciência foi extremamente relevante para minha formação profissional.

Aos colegas, Doutorandos Ricardo Fendrich, Lígia Barizon, Dr^a Silvana Alban pela grande contribuição na área laboratorial, o meu muito obrigado;

À Dr^a Juliana Seger Link pela importante contribuição nesse estudo com as amostras controle negativo e pelas valiosas palavras de apoio;

Ao Dr^o Hervé Rogez pela presteza e atenção no fornecimento de amostras de açai para realização dos experimentos;

À Jéssica de Oliveira Bescrovaine pelo auxílio nas etapas iniciais do trabalho;

Ao Doutor Emmanuel Maltempi pelo do Departamento de Bioquímica pelo empréstimo do equipamento de *Real Time* PCR do laboratório de equipamentos multi-usuário;

À Dr^a Michele Tadra e Valter Antônio de Baura do departamento de Bioquímica pelo apoio e esclarecimentos técnicos;

A minha grande amiga Renata Borges Rodrigues que sempre esteve presente nos momentos mais importantes da minha vida, pelo apoio incondicional e conselhos, muito além do que nossa idade exigia, partilhados ao longo de todos esse anos. Sua presença em minha vida foi fundamental para que me tornasse a pessoa que sou hoje. Tenho certeza que fizemos valer a idéia de que uma amizade verdadeira nunca acaba, nem mesmo a distância e as intempéries da vida. Te amo muito minha grande e eterna amiga;

Aos amigos do SENAI (Roberto Alves, Hellena Lira, Adriana Martini, Valéria Castro e Karla Neres), em especial ao André David, Thiago Ferri e Fernanda Papa, que embarcaram nessa empreitada, tornando possível a realização de um sonho;

Enfim, tenho certeza que todos esses agradecimentos em poucas e humildes palavras são pequenos diante da grandeza que significou cada uma destas pessoas tão importantes, mas certamente, o que foi construído nesses anos só foi possível por que pessoas especiais estavam ao meu lado.

“A natureza é exatamente simples, se conseguirmos encará-la de modo apropriado. Essa crença tem-me auxiliado, durante toda a minha vida, a não perder as esperanças, quando surgem grandes dificuldades de investigação.”

Albert Einstein

RESUMO

A Doença de Chagas é uma enfermidade causada por *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) que afeta milhões de pessoas na América Latina. No diagnóstico da doença, testes sorológicos, detecção direta do parasito ou PCR convencional são usados como testes confirmatórios. Porém, estes métodos apresentam restrições quanto à sensibilidade e especificidade. Além disso, microepidemias associadas a alimentos vem demonstrando a importância crescente na via de transmissão oral, a partir do ciclo silvestre. Assim, padronizar metodologias com melhor sensibilidade e especificidade, para detectar o parasito em humanos e em alimentos é necessária. O objetivo desse trabalho foi padronizar a técnica de *Real Time* PCR para avaliar pacientes chagásicos crônicos e contatos, assim como detectar *T. cruzi* em alimentos, favorecendo a implantação dessa metodologia em laboratórios, bancos de sangue e como ferramenta no monitoramento do parasito em sangue e alimentos. Para tal, foram desenhados seis iniciadores (Ep1F/Ep1R, Ep2F/Ep2R, Bp1F/Bp1R, Bp2F/Bp2R, Bp3F/Bp3R e Bp4F/Bp4R) usando as sequências das cepas referência de *T. cruzi* y152 e Esmeraldo obtidas no genbank. Além destes, primers conhecidos e validados pela literatura foram também incluídos a título de comparação (TCZ1/TCZ2 e S35/S36). Para a otimização da técnica (concentração de primers e de DNA e CT de amplificação), foram usadas cepas de *T. cruzi*, *T. rangeli* e de *Leishmania* sp. Após a padronização a melhor especificidade analítica foi observada para o primer Bp1F/Bp1R (detectou apenas *T. cruzi*). O primer Ep1F/Ep1R permitiu detectar 0,0001 ng/μL do parasito e para TCZ1/TCZ2 a detecção mínima foi de 0,00001 ng/μL de DNA do parasito pela análise da curva padrão. Para validar a metodologia padronizada foram avaliadas 66 amostras de pacientes com doença de Chagas de regiões endêmicas (Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul), 11 amostras de indivíduos com relação de parentesco com os pacientes (contatos), e 30 indivíduos que não possuíam nenhum histórico ou diagnóstico para presença do parasito. Essas amostras foram submetidas à técnica de *Real Time* PCR aqui padronizada com os primers TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R. A análise da curva ROC usando os primers TCZ1/TCZ2 mostrou uma sensibilidade de 79,2% e especificidade 69,8% (AUC = 69,2%). Para os primers Ep1F/Ep1R a sensibilidade foi 71,7% e especificidade 76,7% (AUC = 77,4%). O teste de *McNemar* demonstrou que ambos os iniciadores apresentaram maior discordância de resultados com a reação de imunofluorescência (RIFI) em pacientes chagásicos. Em indivíduos contatos o primer Ep1F/Ep1R apresentou maior discordância com a RIFI e ensaio imunoenzimático (ELISA). TCZ1/TCZ2 não apresentou discordância relevante. Ep1F/Ep1R demonstrou maior positividade (72,72%) para esse grupo. Portanto, o primer Ep1F/Ep1R assumiu melhor desempenho quanto à especificidade na determinação de *T. cruzi* em amostras de sangue que TCZ1/TCZ2. Em amostras de açaí, quando avaliado o açaí *in natura* (sem tratamento prévio) foi obtido 33% de sensibilidade para cepa de *T. cruzi* isolada de humanos (HC27) e 76% para a cepa isolada de *Panstrongylus megistus* (CUR98). Para amostras de açaí autoclavada verificou-se 71% de resultados positivos para ambas as cepas referidas acima. Além disso, em amostras contaminadas artificialmente com *T. cruzi* (cepa HC27) o limite de detecção foi de 0,75 parasito (p)/mL e com a cepa CUR98 a detecção mínima foi de 0,000019 p/mL. Dentre os primers desenhados Ep1F/Ep1R apresentou bons resultados na determinação de *T. cruzi* em sangue e açaí, o que encoraja a utilização da técnica de *Real Time* PCR para o monitoramento de amostras de açaí.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. *Real Time* PCR. Sangue. Açaí. Primers. Sensibilidade. Especificidade.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909, and affects millions of people in Latin America. Diagnostic tests to confirm the disease include indirect tests (antibody in serum), direct detection of the parasite in blood and conventional PCR (DNA detection). However, these methods have limitations because the serological tests detect antibodies and not the parasite, or have low sensitivity (e.g., the parasite is in the internal organs or the chronic phase). In addition, microepidemics associated with foods have shifted the emphasis to the oral route of transmission during the silvatic cycle. Therefore, standardized methodologies with improved sensitivity and specificity are needed to detect the parasite in blood and foods. The aim of this study was to standardize the real-time PCR technique for assessing chronic Chagas patients and contacted individuals, as well as for detecting *T. cruzi* in foods. To accomplish these objectives, six primers were improved (Ep1F/Ep1R, Ep2F/Ep2R, Bp1F/Bp1R, Bp2F/Bp2R, Bp3F/Bp3R and Bp4F/Bp4R) using the sequences of reference strains (*T. cruzi* y152 and Emerald) obtained from GenBank. Known primers validated in the literature were also included (TCZ1/TCZ2 and S35/S36). *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania* sp. strains were employed for optimization (concentration of primers, DNA and CT amplification). The best analytical specificity was observed for the Bp1F/Bp1R primer. The Ep1F/Ep1R primer had minimum detection of 0.0001 ng/ μ L, while TCZ1/TCZ2 had minimum detection of 0.00001 ng/ μ L of DNA from the parasite, based on an analysis of the standard curve. To validate the standardized methodology, 66 samples from chronic patients in endemic regions (Paraná, São Paulo and Rio Grande do Sul) were assessed, along with 11 samples from patients' relatives (contacts) and 30 individuals with no history or diagnosis for the presence of the parasite. The samples were submitted to the standardized real-time PCR technique with the TCZ1/TCZ2 and Ep1F/Ep1R primers. On analysis of the ROC curve, Ep1F/Ep1R had 71.7% sensitivity and 76.7% specificity (AUC = 77.4%), while TCZ1/TCZ2 exhibited 79.2% sensitivity and 69.8% specificity (AUC = 69.2%). McNemar's test showed that both primers had greater discordance in their results with the immunofluorescence reaction (IFR) in Chagas patients. Ep1F/Ep1R performed better than the TCZ1/TCZ2 primer, in terms of specificity for the determination of *T. cruzi* in blood samples. In açai samples, an assessment of açai *in natura* (without previous treatment) revealed 33% sensitivity for the *T. cruzi* when HC27 strain isolated from humans was used and 76% for the CUR98 strain isolated from *Panstrongylus megistus*. In autoclaved açai samples, 71% positivity was detected for both strains. In addition, for artificially samples infected with HC27 strain, the limit of detection was 0.75 parasites (p)/mL, whereas the minimum detection for the CUR98 strain was 0.000019 p/mL. Ep1F/Ep1R showed good results in determining *T. cruzi* in blood and açai, favoring the use of the real-time PCR technique for screening blood and açai samples.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Real Time PCR. Blood. Açai. Primers. Sensitivity. Specificity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1:** CICLO BIOLÓGICO DO PARASITO25
- FIGURA 2:** DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE LINHAGENS FILOGENÉTICAS DO *Trypanosoma cruzi*.....28
- FIGURA 3:** NOMENCLATURA DE *Trypanosoma cruzi* DE ACORDO COM OS DIFERENTES AUTORES.29
- FIGURA 4:** MUNICÍPIOS COM CASOS REGISTRADOS DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA NO PERÍODO DE 2000 A 2011.42
- FIGURA 5:** SEQUÊNCIA CEPA CL BRENER LINHAGEM IIE - ACCES NUMBER U89779.1 *Trypanosoma cruzi* 18S RIBOSSOMAL RNA GENE, PROMOTER REGION.69
- FIGURA 6:** SEQUÊNCIA DA CEPA DE *Trypanosoma cruzi* CANIII – ACESS NUMBER EU178923.....69
- FIGURA 7:** SEQUÊNCIA DA CEPA DE *Trypanosoma cruzi* ESMERALDO CL3 CLONE 2 18S GENE RNA RIBOSSOMAL, SEQUÊNCIA PARCIAL.70
- FIGURA 8:** AVALIAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DOS PARES DE PRIMER TCZ1/TCZ2 (CURVA EM VERMELHO) E S35/S36 (CURVA EM AZUL).....71
- FIGURA 9:** CURVAS DE MELTING (A) E CURVA DE AMPLIFICAÇÃO (B) PARA O PRIMER TCZ1/TCZ2 OBTIDAS COM O DNA DE VÁRIAS CEPAS DE *T. cruzi*, *T. rangeli* E *Leishmania* NA CONCENTRAÇÃO DE 1 ng/μL DE DNA. 75
- FIGURA 10:** CURVAS DE *MELTING* (A) E CURVA DE AMPLIFICAÇÃO (B) PARA OS PRIMERS EP1F/EP1R E BP1F/BP1R OBTIDAS COM O DNA DE VÁRIAS CEPAS DE *T. cruzi*, *T. rangeli* E *Leishmania* CONCENTRAÇÃO DE 1 ng/μL DE DNA.....76
- FIGURA 11:** CURVA PADRÃO PARA O PRIMER TCZ1/TCZ2 GERADA A PARTIR DA REGIÃO LINEAR DE CADA AMPLIFICAÇÃO COMAS DILUIÇÕES SERIADAS 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 E 0,00001 ng/μL DE DNA DA CEPA HC27 (A); CURVA DE *MELTING* COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (B); CURVA DE AMPLIFICAÇÃO COM AS 7 DILUIÇÕES SERIADAS COM

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (C);80

FIGURA 12: CURVA PADRÃO PARA O PRIMER EP1F/EP1R GERADA A PARTIR DA REGIÃO LINEAR DE CADA AMPLIFICAÇÃO COM AS DILUIÇÕES SERIADAS 1, 0,1, 0,01, 0,001 E 0,0001 ng/ μ L DE DNA DA CEPA HC27 (A); CURVA DE *MELTING* COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (B); CURVA DE AMPLIFICAÇÃO COM AS 5 DILUIÇÕES SERIADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (C);81

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1:** ESTABELECIMENTO DO PONTO DE CORTE PELA CURVA ROC, UTILIZANDO O INICIADOR TCZ1/TCZ2 EM AMOSTRAS DE PACIENTES.....83
- GRÁFICO 2:** ESTABELECIMENTO DO PONTO DE CORTE PELA CURVA ROC, UTILIZANDO O INICIADOR EP1F/EP1R EM AMOSTRAS DE PACIENTES.....84
- GRÁFICO 3:** GRÁFICO DE MÚLTIPLAS VARIÁVEIS DOS INICIADORES TCZ1/TCZ2 E EP1F/EP1R EM AMOSTRAS DE PACIENTES.....85
- GRÁFICO 4:** RESULTADOS POSITIVOS NA DETECÇÃO DE *T. cruzi* EM AMOSTRAS DE AÇAÍ AUTOCLAVADO E IN NATURA CONTAMINADAS COM CEPA HC27.....96
- GRÁFICO 5:** RESULTADOS POSITIVOS NA DETECÇÃO DE *T. cruzi* EM AMOSTRAS DE AÇAÍ AUTOCLAVADO E IN NATURA CONTAMINADOS COM A CEPA CUR98.....97

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** CASOS DE DC AGUDA UF/BRASIL NO PERÍODO DE 2005 A 2010.. 37
- TABELA 2:** PARASITOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DE ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS.....55

TABELA 3: CONCENTRAÇÃO E VOLUME DOS REAGENTES UTILIZADOS NA <i>REAL TIME</i> PCR.....	59
TABELA 4: CARACTERÍSTICAS TEÓRICAS OBTIDAS PELO OLIGOCALC DOS FRAGMENTOS DELIMITADOS PELOS PRIMERS DESENHADOS EM SOFTWARE PRIMER EXPRESS PARA <i>REAL TIME</i> PCR NA DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR <i>T. cruzi</i>	68
TABELA 5: RESULTADOS DA PRIMEIRA TITULAÇÃO DOS PRIMERS NAS CONCENTRAÇÕES 100, 300, 600, 1200 E 2000 nM.	72
TABELA 6: RESULTADO DA TITULAÇÃO DOS 6 PRIMERS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (100, 200 E 300 nM) QUANTO A OCORRÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO PARA CEPA DE <i>T. cruzi</i>	73
TABELA 7: RESULTADOS DOS PRIMERS TESTADOS COM <i>POOL</i> DE AMOSTRAS DE SANGUE DE INDIVÍDUOS CONTROLES NEGATIVOS.	74
TABELA 8: AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS SELECIONADOS SUBMETIDOS A CEPAS VARIADAS E OS RESPECTIVOS VALORES DE Ct EM AMOSTRAS POSITIVAS.	76
TABELA 9: RESULTADOS DAS TEMPERATURAS DE DISSOCIAÇÃO DOS PRIMERS SELECIONADOS SUBMETIDOS A CEPAS VARIADAS.....	78
TABELA 10: MÉDIA DOS VALORES DE CTS EM TRIPLICATAS PARA OS PRIMERS TCZ1/TCZ2 E EP1F/EP1R EM CADA PONTO DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA PADRÃO.	82
TABELA 11: COMPARAÇÃO DOS DADOS DAS CURVAS ROC DOS PRIMERS TCZ1/TCZ2 E EP1F/EP1R.....	85
TABELA 12: CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DO MÉTODO <i>REAL TIME</i> PCR COM O PRIMER TCZ1/TCZ2 EM RELAÇÃO AOS TESTES RIFI, ELISA E PCR CONVENCIONAL EM AMOSTRAS DE 66 PACIENTES USANDO O TESTE DE MCNEMAR.	87
TABELA 13: CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DO MÉTODO <i>REAL TIME</i> PCR COM O PRIMER EP1F/EP1R EM RELAÇÃO AOS TESTES RIFI, ELISA E PCR CONVENCIONAL EM AMOSTRAS DE 66 PACIENTES USANDO O TESTE DE <i>MCNEMAR</i>	87

TABELA 14: RESULTADOS DA ANÁLISE DE DISCORDÂNCIA COM O TESTE DE MCNEMAR PARA <i>REAL TIME</i> PCR COM OS PRIMERS TCZ1/TCZ2 E EP1F/EP1R.....	88
TABELA 15: POSITIVIDADE (%) DE 66 AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES AVALIADAS POR <i>REAL TIME</i> PCR COM OS INICIADORES TCZ1/TCZ2 E EP1F/EP1R, ELISA, RIFI E PCR _c – TCZ1/TCZ2.	88
TABELA 16: RESULTADOS DA ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA COM O TESTE DE MCNEMAR PARA <i>REAL TIME</i> PCR COM OS PRIMERS TCZ1/TCZ2 E EP1F/EP1R EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS CONTATOS.	89
TABELA 17: CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DO MÉTODO <i>REAL TIME</i> PCR COM O PRIMER TCZ1/TCZ2 EM RELAÇÃO AOS TESTES RIFI, ELISA E PCR CONVENCIONAL EM AMOSTRAS DE CONTATOS USANDO O TESTE DE MCNEMAR.	90
TABELA 18: CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DO MÉTODO <i>REAL TIME</i> PCR EP1F/EP1R COM RIFI, ELISA E PCR _c EM AMOSTRAS DE CONTATOS, PELO TESTE DE MCNEMAR.....	90
TABELA 19: POSITIVIDADE (%) DE 11 AMOSTRAS DE SANGUE DE FAMILIARES DE PACIENTES CRÔNICOS AVALIADAS POR <i>REAL TIME</i> PCR COM OS INICIADORES TCZ1/TCZ2 E EP1F/EP1R, ELISA, RIFI E PCR _c – TCZ1/TCZ2.....	91
TABELA 20: ALGORITMO PARA O ESTABELECIMENTO DE UMA AMOSTRA COMO POSITIVA.	92
TABELA 21: RESULTADOS DOS LIMITES DE DETECÇÃO DA CEPA CUR98 PARA A TÉCNICA DE <i>REAL TIME</i> PCR EM AMOSTRAS DE AÇAÍ.	94
TABELA 22: RESULTADOS DOS LIMITES DE DETECÇÃO DA CEPA HC27 PARA A TÉCNICA DE <i>REAL TIME</i> PCR EM AMOSTRAS DE AÇAÍ.....	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ΔG –	Variação da energia livre de Gibbs
μL –	Microlitro
AEQ –	Programa de Avaliação Externa da Qualidade
ANVISA –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC –	<i>Area Under the Curve</i>
BPF –	Boas Práticas de Fabricação
cDNA -	Ácido Desoxirribonucleico complementar
Ct –	<i>Cycle Threshold</i>
DC –	Doença de Chagas
DNA –	Ácido Desoxirribonucleico
DTA –	Doença Transmitida por Alimentos
DTU –	<i>Discrete Taxonomic Units</i>
EDTA –	Ácido Etileno Diamino Tetracético
ELISA –	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPI –	Equipamento de Proteção Individual
EUA –	Estados Unidos da América
Fg –	Fentograma
GEB –	Hidrocloreto de Guanidina – EDTA
HAI –	Hemoaglutinação Indireta
IgG –	Imunoglobulina G
kDNA -	Ácido Desoxirribonucleico do cinetoplasto
LIT –	<i>Liver Infusion Triptose</i>
M –	Concentração molar
mL –	Millilitro
NCBI –	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ng –	Nanograma
nM –	Nanomolar
NNN –	<i>Novy McNeal Nicolle</i>
°C –	Graus <i>Celsius</i>
OPAS –	Organização Pan Americana de Saúde
p/mL –	Parasitas/mililitro

Pb –	Pares de bases
PBS –	Tampão fosfato salino
PCR –	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH –	Potencial Hidrogeniônico
qPCR –	<i>Polimerase Chain Reaction</i> Quantitativo
R ² –	Coefficiente de regressão
RDC –	Resoluções de Diretoria Colegiada
RIFI –	Reação de Imuno Fluorescência Indireta
RNAse –	Enzima que degrada ácido ribonucleico
ROC –	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RPMI –	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
SDS –	Dodecil Sulfato de Sódio
SUS –	Sistema Único de Saúde
<i>T. cruzi</i> –	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TCI –	<i>T. cruzi</i> grupo I
TCII –	<i>T. cruzi</i> grupo II
TE –	Tris HCl – EDTA
T _m –	Temperatura de <i>melting</i>
UV –	Ultravioleta
WHO –	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	OBJETIVOS	22
2.1.	GERAL.....	22
2.2.	ESPECÍFICOS.....	22
3.	REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1.	O PARASITO	23
3.1.1.	Ciclo Biológico	23
3.1.2.	Morfologia	25
3.1.3.	Taxonomia e Variabilidade Genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
3.2.	OS VETORES.....	30
3.3.	VIAS DE TRANSMISSÃO	32
3.3.1.	Vetorial	32
3.3.2.	Transfusional	32
3.3.3.	Vertical, Congênita ou Via Transplantes	33
3.3.4.	Acidental e Biossegurança	35
3.3.5.	Oral	36
3.4.	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLÓGICA	40
3.5.	DIAGNÓSTICO	42
3.5.1.	Exame Clínico	42
3.5.2.	Exames Parasitológicos	43
3.5.2.1.	Pesquisa a Fresco de Tripanossomatídeos.....	43
3.5.2.2.	Métodos de Concentração de Formas Tripomastigotas	44
3.5.2.3.	Exame de Gota Espessa ou Esfregaço.....	44
3.5.3.	Exames Indiretos Parasitológicos	45
3.5.4.	Exames sorológicos	46
3.5.5.	Exames Moleculares	48
3.5.5.3.	PCR convencional.....	48
3.5.5.4.	<i>Real Time</i> PCR	49
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1.	ASPECTOS BIOÉTICOS DA PESQUISA	54
4.2.	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAL TIME PCR	54
4.2.1.	Amostras	54
4.2.1.1.	Culturas de Trypanossomatídeos	54
4.2.2.	Extração de DNA	56

4.2.3.	Avaliação e Titulação dos Primers	57
4.2.3.1.	Especificidade Analítica	58
4.2.4.	Curva de Calibração Padrão para Detecção de <i>T. cruzi</i> e Sensibilidade Analítica da Técnica	58
4.3.	DETECÇÃO DE <i>T. cruzi</i> POR <i>REAL TIME</i> PCR EM PACIENTES CRÔNICOS, CONTATOS E CONTROLES NEGATIVOS	59
4.3.1.	População e Local de Estudo	59
4.3.2.	Extração de DNA de Pacientes Chagásicos Crônicos	60
4.3.3.	Extração de DNA de Indivíduos Controles Negativos	60
4.3.4.	Técnica de <i>Real Time</i> PCR para Determinação de <i>Trypanosoma cruzi</i> em Amostras de DNA de Pacientes	62
4.4.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62
4.4.1.	Estabelecimento de Variáveis Estatísticas Empregando a Curva ROC	63
4.5.	MONITORAMENTO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EM AMOSTRAS DE AÇAÍ POR CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL.....	63
4.5.1.	Amostras de Açaí e Contaminação Experimental com <i>T. cruzi</i>	63
4.5.2.	Extração do DNA das Amostras de <i>T. cruzi</i> em Açaí	64
4.5.3.	<i>Real Time</i> PCR para o Monitoramento do <i>Trypanosoma cruzi</i> em Amostras de Açaí	65
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1.	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE <i>REAL TIME</i> PCR	67
5.1.1.	Região Alvo e Desenho de Primers	67
5.1.2.	Avaliação e Titulação dos Primers	70
5.1.2.1.	Determinação da Concentração Ideal de <i>Primer</i>	72
5.1.2.2.	Especificidade Analítica	74
5.1.3.	Curva de Calibração Padrão para Detecção de <i>T. cruzi</i> e Verificação da Sensibilidade Analítica	78
5.2.	VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE <i>REAL TIME</i> PCR COM OS PRIMERS TCZ1/TCZ2 E EP1F/EP1R EM PACIENTES CRÔNICOS E CONTATOS	82
5.2.1.	Amostragem	82
5.2.2.	Análises estatísticas	82
5.2.2.1.	Estabelecimento de Variáveis Estatísticas Empregando a Curva ROC.....	82
5.2.2.2.	Comparação de Metodologias com o <i>Real Time</i> PCR para o Diagnóstico de <i>T. cruzi</i> em Pacientes	85
5.2.2.3.	Comparação de Metodologias com o <i>Real Time</i> PCR para o Diagnóstico de <i>T. cruzi</i> em Indivíduos Contatos.....	89

5.2.3.	Real Time PCR TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R na Determinação de <i>T. cruzi</i> em Pacientes Crônicos e Contatos	92
5.3.	REAL TIME PCR PARA MONITORAMENTO DE <i>T. cruzi</i> EM AMOSTRAS DE AÇAÍ	93
6.	CONCLUSÃO	98
7.	PERSPECTIVAS	100
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXOS	138

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas (DC), causada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) afeta cerca de 10 milhões de pessoas, em pelo menos 21 países, do continente Americano. Essa doença parasitária tem manifestação clínica variável, apresentando desde casos assintomáticos até estágios crônicos severos. A fase crônica é caracterizada pela alta presença de anticorpo específico e a baixa parasitemia. Em geral, as manifestações clínicas da doença são: febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, entretanto sabe-se que estes sintomas são altamente dependentes da resposta imune do paciente (PRATA, 1968; SOARES, SANTOS, 1999; MARIM, 2003; WHO, 2007).

Nas diferentes áreas endêmicas, populações distintas de parasitos podem existir e influenciar na patogênese, e conseqüentemente nas formas clínicas observadas, na severidade da DC e na susceptibilidade aos medicamentos. As populações do parasito são classificadas em duas principais linhagens filogenéticas, *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII). A linhagem II é subdividida e designadas TcIIa a TcIIe. Portanto, existem seis *Discrete Taxonomic Units* (DTU) (MACEDO, PENA, 1998; RECOMMENDATIONS from a satellite meeting, 1999; BRISSE, BARNABE, TIBAYRENC, 2000; TOLEDO *et al.*, 2002; TOLEDO *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2004; ZINGALES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012).

A transmissão de *T. cruzi* se dá pelas fezes do vetor, transfusão de sangue e pela via congênita. As vias alternativas de transmissão são: oral, transplantes de órgãos e via acidental. Estudos mostram ainda que a contaminação, hipoteticamente, poderia acontecer por via sexual (SILVA, 2013).

Após o controle das principais vias de transmissão (eliminação de vetores em domicílios e rigor na seleção de doadores de sangue) nos países endêmicos as vias consideradas alternativas passam a assumir maior importância na transmissão do parasito. No cenário mundial a DC passa a impactar como doença emergente, pois com a globalização e o livre trânsito de pessoas pelo mundo, os países não endêmicos passaram a assinalar a DC. Exemplo disso são os sete casos autóctones de DC registrados nos Estados Unidos e a comprovação de transmissão congênita e transfusional documentada em países como Espanha, Canadá e Suíça (CHIEFFI, AMATO NETO, 2000; BRASIL, 2005; DIAS, MACÊDO, 2005; CASTRO *et al.*, 2009; GASCON, BERN, PINAZO, 2010; BERN *et al.*, 2011).

A transmissão por transfusão sanguínea foi exposta e confirmada em 1952 no Brasil. Em função da urbanização da doença houve também aumento na prevalência de doadores infectados nos bancos de sangue nacionais, fato observado também em outros países da América Latina. Na década de 70 pelo menos 20 mil novos casos anuais da doença foram verificados no Brasil por essa via de transmissão. A contaminação depende da presença do parasito no sangue ou componente transfundido, do tipo de produto sanguíneo infectado, do estado imunológico do indivíduo receptor, do nível de cobertura sorológica e da sensibilidade dos testes diagnósticos empregados na seleção dos doadores (FREITAS *et al.*, 1952; DIAS, 1991; SCHMUNIS, 1991; SCHMUNIS, 1997; SCHOFIELD, JANIN, SALVATELLA, 2006).

Na região Norte do Brasil, na última década a via de transmissão oral vem recebendo maior destaque em função de microepidemias ocorridas em vários estados. As formas tripomastigotas metacíclicas do parasito presente em alimentos são ingeridas, causando o quadro agudo da DC. A polpa de açaí é um alimento muito consumido na região norte pelos aspectos nutricionais e econômico-culturais envolvidos. O açaí e o caldo de cana têm sido fortemente associados à ocorrência de DC aguda em epidemias recentes. O primeiro, tem sido incriminado pela provável contaminação dos frutos ou da polpa por dejetos de animais reservatórios ou triatomíneos infectados. Estudos realizados comprovam evidências de que há manutenção da viabilidade e virulência do parasito após o contato com a matriz alimentícia do açaí, e por esse motivo é que nesse estudo se busca otimizar a técnica de *Real Time* PCR para o monitoramento de *T. cruzi* nessas amostras (ROGEZ, 2000; CAMANDAROBÁ, PINHEIRO LIMA, ANDRADE, 2002; PÉREZ-GUTIÉRREZ, AGRELO, FIGUEROA, 2006; DIAS *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2010; PASSOS *et al.*, 2012). Com relação ao segundo foram relatados surtos de DC por transmissão de *T. cruzi* em caldo de cana em Navegantes-SC em 2005 (PÉREZ-GUTIÉRREZ, AGRELO, FIGUEROA, 2006).

A redução da mortalidade e o aumento da sobrevivência de indivíduos infectados é consequência de melhor conhecimento sobre a história natural da DC, e o aperfeiçoamento do cuidado clínico e cirúrgico de indivíduos portadores, independente da via de transmissão (RAMOS Jr. *et al.*, 2010; MARTINS-MELO *et al.*, 2012; MARTINS-MELO, HEUKELBACH, 2013).

A baixa sensibilidade de técnicas parasitológicas clássicas ocorre em função da baixa parasitemia característica da fase crônica da DC. Por essa razão, para a

detecção ou diagnóstico de *T. cruzi* são realizados principalmente técnicas sorológicas. Entretanto, resultados falsos negativos têm sido descritos (LUQUETTI, RASSI, 2000). As técnicas moleculares por sua vez, em especial a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem se tornado uma ferramenta indispensável no diagnóstico de doenças infecciosas, apresentando maior sensibilidade em comparação as técnicas parasitológicas tradicionais. A variação da especificidade e sensibilidade da técnica de PCR depende de vários fatores como volume e conservação da amostra, o método usado para extrair o DNA, sequência do DNA do parasito amplificada, qualidade dos reagentes utilizados, *primers* selecionados e ainda condições dos ciclos de temperatura. Em contrapartida, a tecnologia da *Real Time* PCR tem revolucionado o diagnóstico molecular, usando marcador fluorescente ou sondas para o monitoramento contínuo da amplificação do fragmento de DNA desejado. As principais vantagens dessa técnica são: rapidez dos resultados e redução do risco de contaminação, pela eliminação da fase de pós - PCR, da PCR convencional. A técnica de *Real Time* PCR pode ainda ser otimizada para determinação qualitativa e quantitativa (JUNQUEIRA *et al.*, 1996; VIRREIRA *et al.*, 2003; MACKAY, 2007; PIRON *et al.*, 2007; SCHIJMAN *et al.*, 2011). A combinação de sensibilidade e especificidade, baixo risco de contaminação e melhor velocidade de trabalho tem feito a tecnologia de *Real Time* PCR ser uma ferramenta altamente aplicável, seja em análise da expressão de genes, quantificação de parasitos ou em muitas outras aplicações no campo da pesquisa (DUFFY *et al.*, 2009; DE FREITAS *et al.*, 2011).

Considerando a importância no âmbito da saúde pública, no avanço das pesquisas sobre a DC o objetivo desse trabalho foi realizar a otimização da técnica de *Real Time* PCR com o uso de novos primers.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Aperfeiçoar a técnica de *Real Time* PCR para pesquisa de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos crônicos e contatos, e em alimentos.

2.2. ESPECÍFICOS

- Otimizar a técnica de *Real Time* PCR com o uso de novos primers para determinação de *T. cruzi*;
- Avaliar indivíduos portadores de DC crônica e que tenham contato com portadores de DC crônica do Hospital das Clínicas de Curitiba;
- Determinar a sensibilidade da técnica para pesquisa de DNA de *T. cruzi* em alimentos como o açaí;

3. REVISÃO DA LITERATURA

Trypanosoma cruzi (CHAGAS, 1909) é um protozoário flagelado, que causa DC ou Tripanossomose Americana em humanos. Esse parasito tem dois tipos de hospedeiros: vertebrado e invertebrado. Nos hospedeiros vertebrados são encontradas as formas tripomastigotas no sangue e amastigota em tecidos. Nos hospedeiros invertebrados são encontradas as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. O parasito é transmitido por dejetos infectados de triatomíneos. Mas também pode ocorrer por via transmamária, trasnplacentária e por via oral com a ingestão de formas tripomastigotas, além de transfusão sanguínea (BRASIL, 2005; WHO, 2007; OPAS, 2008). Já os hospedeiros invertebrados se infectam ao sugar sangue de hospedeiros vertebrados contaminados com o parasito.

3.1. O PARASITO

3.1.1. Ciclo Biológico

São conhecidos dois ciclos de transmissão de *T. cruzi*, ciclo silvestre e doméstico. O primeiro ciclo é considerado original da tripanossomíase americana, e estão implicados mais de duzentas espécies entre hospedeiros vertebrados e triatomíneos silvestres. O parasito encontra-se circulante no meio silvestre por meio do inseto vetor. Entretanto, apesar do grande número de informações que se tem no meio científico, os ciclos da DC nos animais/mamíferos do meio silvestre ainda não estão completamente esclarecidos. Isso acontece devido a grande complexidade dos hospedeiros e vetores envolvidos no ciclo de *T. cruzi* (ARGOLO *et al.*, 2008).

O ciclo doméstico por sua vez é bastante conhecido no meio científico e estão inseridos nesse ciclo o homem, animais sinantrópicos e triatomíneos domiciliares. Esse ciclo surgiu da ocupação de ecótopos silvestres pelo Homem, que transformou esses meios em vilas habitadas, proporcionando aos vetores abrigo e alimento abundante, iniciando assim ao ciclo epidemiológico da doença. Essas modificações provocadas pelo homem no ambiente natural mudaram o comportamento dos insetos vetores, fazendo com que houvesse a formação de novos ciclos de transmissão da DC, por meio de espécies até então silvestres, mas que passaram a transmitir o parasito de maneira peri e intradomicíliar (ARGOLO *et al.*, 2008).

Os animais vertebrados infectados presentes em ambos os ciclos de transmissão, apresentam na corrente sanguínea as formas tripomastigotas, que são infectantes ao triatomíneo quando o mesmo faz o repasto sanguíneo. As formas tripomastigotas sanguíneas que foram ingeridas migram até o estômago do inseto, onde passam por um processo de diferenciação em formas epimastigotas, cujo cinetoplasto está próximo ao núcleo, membrana ondulante curta e flagelo livre. Estas formas se movimentam em direção ao intestino médio onde conseguem se multiplicar por divisão binária, organizando-se sempre com os flagelos posicionados no centro, de forma agrupada (REY, 2001; LANA, TAFURI, 2005; FERNANDES, ANDREWS, 2012).

Após esta infecção no vetor, as formas epimastigotas do intestino médio do triatomíneo migram para o intestino posterior e se diferenciam na forma infectante, ou seja, em formas tripomastigotas metacíclicos. Podem se apresentar na forma fina, com cinetoplasto grande, redondo e afastado da extremidade posterior, possuem membrana ondulante com núcleo alongado e flagelo livre. A eliminação dessas formas dá-se nas fezes e/ou urina do vetor. Essa eliminação dos estágios evolutivos de *T. cruzi* acontece devido ao fluxo do sangue ingerido pelo inseto no momento do repasto sanguíneo (LANA; TAFURI, 2005; REY, 2001; SILVA, 2007).

Depois do repasto sanguíneo em um vertebrado não infectado, os parasitos na forma de tripomastigotas metacíclicos, liberados nas fezes do triatomíneo, penetram na solução de continuidade da pele, ocorrendo a infecção do hospedeiro vertebrado. Essa infecção das formas tripomastigotas ocorre mediante a invasão das células do sistema fagocítico mononuclear. Ao adentrar-se no interior da célula, o parasito passa por algumas modificações estruturais, dando origem às formas amastigotas, (perderem o flagelo livre e a membrana ondulante), passando a ter morfologia arredondada e movimentação em rotação. Essas amastigotas intracelulares irão se alimentar de microelementos retirados da célula e após algumas horas da invasão, as amastigotas se multiplicam por divisão binária (LANA; TAFURI, 2000; REY, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Ainda dentro do citoplasma da célula, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos que, após algumas horas ocorre a ruptura celular. As formas tripomastigotas, por sua vez caem na corrente sanguínea, invadindo as células de vários tecidos, para que possam dar continuidade a um novo ciclo celular. Vale ressaltar que muitos parasitos também podem ser destruídos pelo sistema

imune do hospedeiro vertebrado, ou até mesmo, podem recomeçar um ciclo ao serem ingeridos por um novo triatomíneo ainda não infectado (Figura 1) (LANA; TAFURI, 2000; REY, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2011; FERNANDES, ANDREWS, 2012).

Apesar de todo o conhecimento sobre o ciclo biológico do parasito, é importante destacar que a intensidade do parasitismo pelo *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado é variável, sendo que isso se deve possivelmente as características genéticas do parasito e do hospedeiro (TEIXEIRA, 2007).

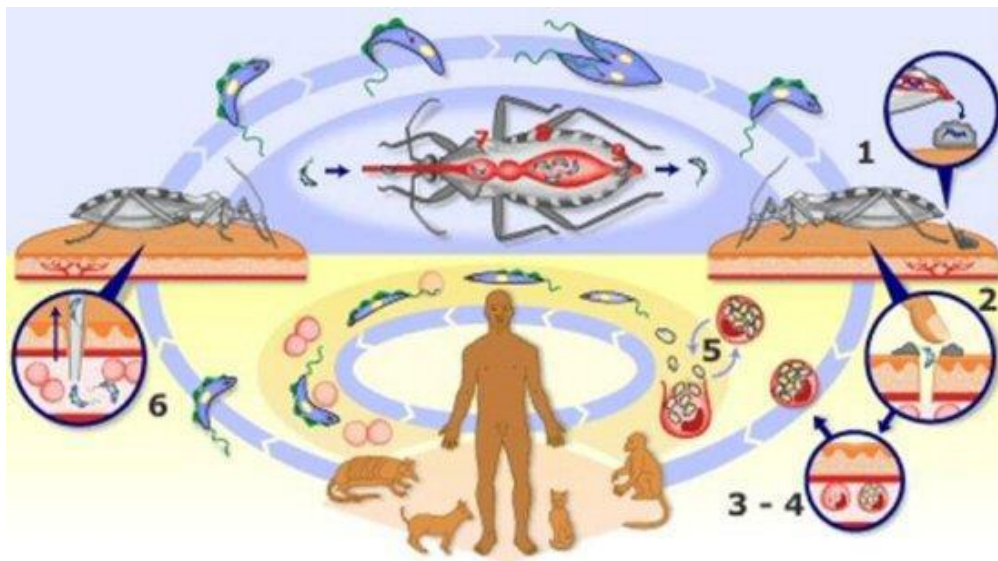


Figura 1: Ciclo biológico do parasito

Fonte: http://www.who.int/tdr/diseases-topics/chagas/chagas_f1.jpg

Legenda: 1 – Repasto sanguíneo em vertebrado não infectado; 2 - Eliminação de formas infectantes nas fezes e/ou urina do vetor e entrada no hospedeiro vertebrado; 3 – 4 - invasão das células do sistema fagocítico mononuclear e diferenciação em formas amastigotas; 5 – Multiplicação das formas amastigotas por divisão binária e diferenciação em tripomastigotas com ruptura das células; 6 - Repasto sanguíneo em vertebrado infectado com formas tripomastigotas;

3.1.2. Morfologia

Nos hospedeiros vertebrados, é possível identificar a forma tripomastigota na corrente sanguínea e amastigotas nos tecidos. Nos triatomíneos, os tripomastigotas sanguíneos se transformam em esferomastigotas, e epimastigotas e se multiplicam por divisão binária. Logo depois se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, presentes nas fezes do inseto vetor e são infectantes (BRASIL, 2005).

A forma amastigota se multiplica no interior das células do hospedeiro vertebrado, apresenta movimentação por rotação, forma ovóide e com ausência de

flagelo. Já a forma tripomastigota, é alongada e flagelada, com ampla movimentação. Quanto a classificação, estes podem ser classificados em tripomastigotas metacíclicos, presente no organismo dos invertebrados e tripomastigotas sanguínicola circulantes no sangue dos vertebrados. Essa forma é flexível e permite uma mobilidade grande ao parasito (ARGOLO *et al.*, 2008).

Observa-se ainda uma forma de transição entre a forma amastigota e tripomastigota, que corresponde a forma epimastigota, que por sua vez são formas muito móveis e se encontram no tubo digestivo do inseto vetor e também em meios artificiais de cultivo. A principal diferença entre os epimastigotas e tripomastigotas se fundamenta no cinetoplasto, que no primeiro se apresenta anterior ao núcleo e membrana ondulante menos evidente que no segundo (DIAS e MACEDO, 2005).

As formas esferomastigotas se multiplicam e são detectadas no estômago do vetor e no vertebrado, possui aspecto arredondado e flagelo livre que sai do cinetoplasto (DIAS e MACEDO, 2005).

Trypanosoma cruzi apresenta como principais organelas o núcleo, o cinetoplasto, o corpo basal e o flagelo. Entretanto, no momento da divisão dos parasitos, esta acontece de forma definitiva e sequencial envolvendo sucessivamente o corpo basal, flagelo, cinetoplasto e núcleo, resultando na clivagem do citoplasma. Entretanto, de todas as organelas citadas a principal responsável pela caracterização e distinção dos estágios morfológicos dos *Trypanosomatidae* é a localização do flagelo ao longo do corpo do parasito, considerando o ponto de partida do flagelo como fundamental nesse processo de identificação das formas. Uma vez que esta característica flagelar foi identificada, a mesma tem se mostrado muito importante para a classificação de cada estágio evolutivo (SILVA *et al.*, 2002).

Após anos da ocorrência da infecção, *T. cruzi* pode ser detectado no sangue em mais de 50% de indivíduos infectados e não tratados. Sabendo disso, é provável que *T. cruzi* em corrente sanguínea pode ser transferido por meio de uma transfusão sanguínea para uma pessoa não infectada. Devido à grande importância e a popularidade encontrada no processo de doação sanguínea, essa forma de transmissão é de fato considerada como sendo a segunda mais comum de aquisição da infecção em função de testes apresentando resultados falsos negativos (WHO, 2007).

3.1.3. Taxonomia e Variabilidade Genética de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi segundo Lineu (1735) faz parte do reino Protista, Filo Euglenozoa, Classe Zoomastigophora, da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, Gênero *Trypanosoma*, Subgênero *Schizotrypanum*, Espécie *Trypanosoma cruzi*. O parasito pode ser facilmente caracterizado pela presença de um flagelo e somente uma mitocôndria (LEVINE *et. al.*, 1980; BRASIL, 2005; NEVES, 2007).

Dentro da família Trypanosomatidae, que é composta por oito gêneros, o gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes, por conter várias espécies que provocam doenças em humanos e em animais. No gênero *Trypanosoma* várias espécies são descritas e agrupadas em sete subgêneros, que são organizados em duas seções: estercoraria e salivaria (HOARE, 1972; BRENNER, ANDRADE, BARRAL-NETO, 2000).

As várias cepas de *T. cruzi* apresentam diferenças relacionadas a forma bioquímica, epidemiológica, patogênica e de resposta ao tratamento. Baseado nas constatações de heterogeneidade populacional, e analisando as diferenças e similaridades encontradas em laboratório, por meio de marcadores celulares, foram padronizados pelo menos duas principais linhagens filogenéticas dentro dessa espécie, denominados *T. cruzi* grupo I (TCI) e *T. cruzi* grupo II (TCII). O primeiro grupo refere - se ao ciclo silvestre, sendo considerado também o mais frequente e o segundo relaciona-se com o ciclo doméstico. Ainda verifica-se que há alguns subgrupos intra-grupos, como quatro haplotipos em TCI (1 – 4) e cinco subgrupos em TCII (a - e). Na Figura 2 é apresentada a distribuição das linhagens de *T. cruzi* (BRENER, 1992; INTERNATIONAL SYMPOSIUM TO COMMEMORATE THE 90TH ANNIVERSARY OF THE DISCOVERY OF CHAGAS DISEASE, 1999; PRATA, 2001; FREITAS *et al.*, 2005; WHO, 2007).

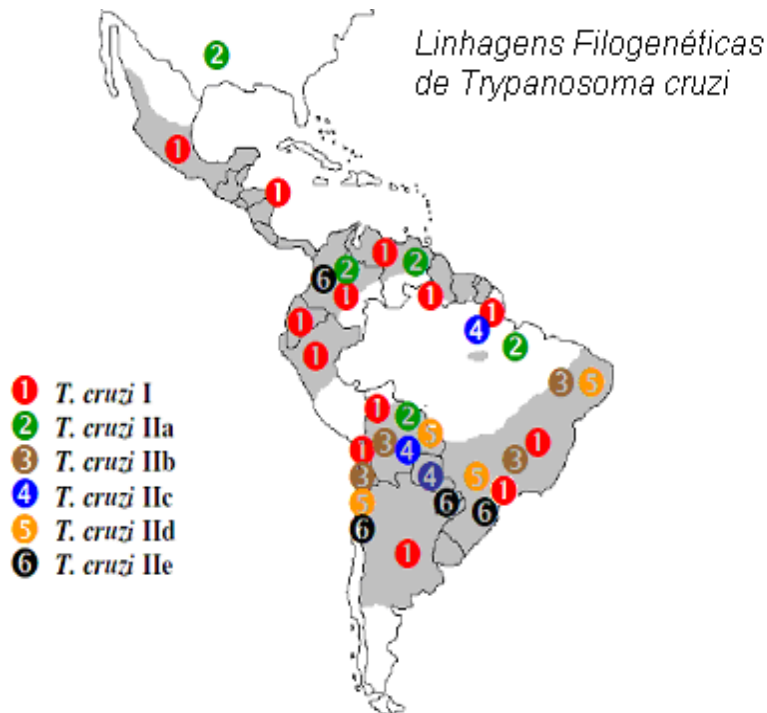


Figura 2: Distribuição geográfica de Linhagens Filogenéticas do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Adaptado de Souto *et al.* 1996; Fernandes *et al.* 1998; Brisse *et al.* 2000 e 2004 (WHO, 2007)

Nesse sentido, é válido destacar que a taxonomia e a variabilidade genética desse parasito têm sido amplamente discutidas e relacionadas. Há duas vertentes, uma que defende a não atribuição de espécie como classificação taxonômica aos grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, e outra que defende a classificação desses grupos como espécies. Os pesquisadores que defendem a classificação como espécies se baseiam na diferença genética que há entre esses grupos assim como em outras espécies já definidas, como *Leishmania donovani* e *Leishmania chagasi* que apresentam diferença genética inferior a dos grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Portanto, para unificar as linhas de pensamento, o desenvolvimento de uma metodologia padrão para a tipagem das DTUs, é importante no sentido de estabelecer as características epidemiológicas e clínicas dos isolados (ZINGALES, 2011).

A denominação para *T. cruzi* I foi usada como correspondência do zimodema 1 ou Tipo III, já *T. cruzi* II foi usado como equivalência o zimodema 2 ou Tipo II. Há também uma terceira linhagem principal de *T. cruzi*, designada como *T. cruzi* III (FREITAS *et al.*, 2005).

O táxon *T. cruzi* atualmente é dividido em seis DTUs, sendo elas: I, IIa, IIb, IIc, II d, IIe, de forma que o DTU I corresponde ao *T. cruzi* I e o DTU IIb ao *T. cruzi* II. As

DTUs IIa, IIc, IIId e IIe estão relacionadas com o zimodema 3 e populações híbridas, conforme pode se verificar na Figura 3 (BRISSE *et al.*, 2000; ZINGALES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012). As populações híbridas, apesar de não serem muito comuns, surgem da fusão de células de *T. cruzi* ou de eventos de hibridização distintos, envolvendo populações das linhagens *T. cruzi* II e *T. cruzi* III (FREITAS *et al.*, 2005).

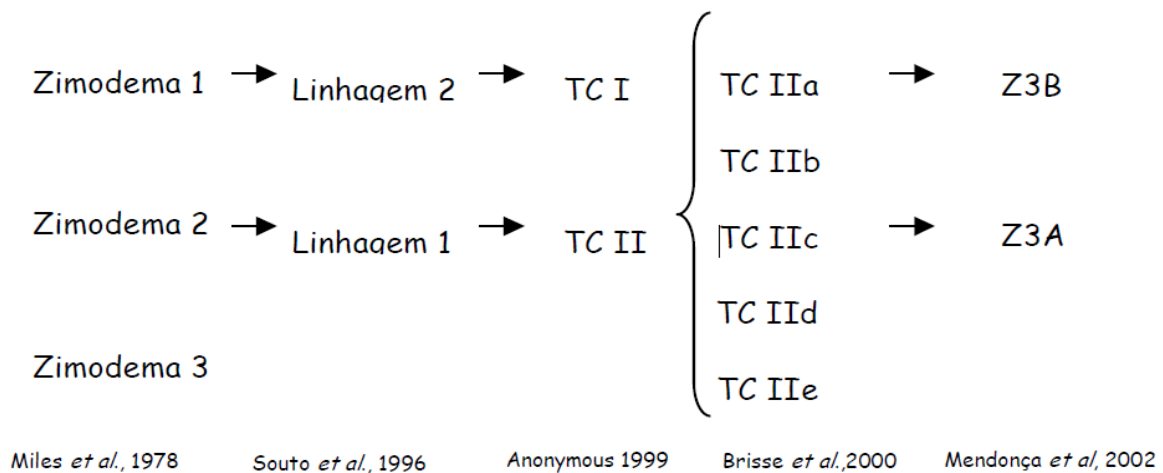


Figura 3: Nomenclatura de *Trypanosoma cruzi* de acordo com os diferentes autores.

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=14>

As cepas de *T. cruzi* II apresentaram grande variabilidade genética devido ao polimorfismo do Ácido Desoxirribonucléico do cinetoplasto (kDNA) presente num mesmo parasito e em diferentes formas clínicas observadas em pacientes. Esse grande polimorfismo deve-se a populações policlonais, além da necessidade de adaptação e sobrevivência em meios diferentes (MACEDO *et al.*, 2004; LAGES-SILVA *et al.*, 2006).

Ao considerarmos a variabilidade genética de *Trypanosoma cruzi*, observa-se que o mesmo pode infectar vários tipos celulares. Entretanto, há cepas com grande tropismo por algumas células específicas de alguns tecidos ou órgãos. Esses tipos celulares, ou clones, estão relacionados com as diferenças regionais da DC, além da intensidade do parasitismo, intensidade da resposta inflamatória, além da formação e evolução da resposta imune. Esses aspectos demonstram a variabilidade genética dos parasitos, assim como diferentes fatores que conduzem à forma clínica da doença no paciente (TAFURI, 1999; GUHL, RAMÍREZ, 2011). Biologicamente essa heterogeneidade de *T. cruzi* tem importância, pois, os ciclos de transmissão, hábitos

alimentares dos vetores e os hospedeiros vertebrados em um determinado ambiente, são definidos mediante a essas características do parasito. O ciclo de transmissão silvestre engloba, na sua maioria, marsupiais e roedores de pequeno porte, já o ciclo doméstico, é caracterizado por acometer o homem, assim como outros mamíferos presentes no ambiente peridomiciliar (WHO, 2002).

Dessa forma, entende-se que variações genéticas tanto do parasito quanto do hospedeiro são fundamentais para determinar as características da forma clínica da doença, considerando que as DTUs de *T. cruzi* identificadas em infecções no homem são muito heterogêneas. A confirmação dessa hipótese foi dada por meio de análises realizadas em material de biopsia, necropsia e a técnica de PCR. Alguns estudos apontaram que variações genéticas do parasito atuam como fator determinante da forma clínica da DC. Esse fato, portanto justificaria a falta de aumento do intestino e do esôfago na forma crônica da doença, assim como as diferenças de susceptibilidade do parasito ao tratamento com medicamentos, quando se compara ocorrências procedentes de países localizados na América central, com países da América do sul (VAGO *et al.*, 2000; WHO, 2007).

Várias populações de *T. cruzi* são policlonais, e ao analisar a história natural desse parasito, é possível observar que pessoas de áreas endêmicas podem se infectar várias vezes a partir de diferentes gêneros e espécies de triatomíneos, que também se alimentam de indivíduos diferentes. Portanto, essa mistura promove a formação de população multiclonais em hospedeiros vertebrados e em vetores (CÔBO, 2009).

3.2. OS VETORES

Atualmente sabe-se que cerca de 140 espécies de triatomíneos apresentam potencial de transmissão e podem ser reconhecidas de acordo com suas características ecoepidemiológicas, como suscetibilidade a diferentes cepas do parasito, e à adaptação a diferentes ambientes. Sabe-se que em ambiente intradomiciliar e peridomiciliar, onde há alimento disponível e esconderijos, o potencial biológico dos triatomíneos é aumentado (JARAMILLO, 2002; HOCHKIRCH *et al.*, 2008; CARO-RIANO *et al.*, 2009; II CONGRESSO NACIONAL DE MEDICINA TROPICAL, 2013).

A América latina abriga grande parte das espécies de hemípteras que fazem parte da subfamília Triatominae. As espécies de triatomíneos de maior importância são: o *Triatoma infestans* presentes nos países do Cone Sul (Bolívia, Paraguai, Argentina, Brasil, Chile e Uruguai), e *Rhodnius prolixus* no norte da América do Sul e América Central. Alguns autores afirmam que são pelo menos sete espécies consideradas como principais vetores de *T. cruzi*, são eles: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T. brasilienses*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*. Porém, há muitas espécies que possuem potencial elevado para uma re-invasão das casas a partir de focos silvestres e que por sua vez podem também transmitir *T. cruzi* ao homem (GALVÃO *et al.*, 2003; II CONGRESSO NACIONAL DE MEDICINA TROPICAL, 2013).

Atualmente no Brasil, entre as várias espécies existentes, *Triatoma infestans* é aquela epidemiologicamente mais importante, que por sua vez foi reconhecida desde início como sendo vulnerável a eliminação, por ser exclusivamente domiciliada (DIAS E SILVEIRA, 2011). Quanto a essa vulnerabilidade, entende-se que espécies de triatomíneos que são introduzidas no meio, desde que não existam espécies nativas no local, podem ser eliminadas, e isso pode significar término da transmissão vetorial no local, devendo-se tomar os cuidados necessários para se impedir uma reinfestação. Com relação às espécies autóctones, estas não podem ser completamente eliminadas. Porém, pode-se acabar com as colônias domiciliares assim como impedir sua recolonização. Portanto, o fato de uma espécie vetora ser introduzida ou autóctone é muito importante para determinar o nível inicial de controle (DIOTAIUTI *et al.*, 1998; DIAS E SILVEIRA, 2011).

Um aspecto importante é a relação existente quanto a movimentação e distribuição dos triatomíneos, especialmente para que haja efetividade nas ações de controle. Essa dispersão acontece de duas formas: uma passiva e outra ativa. Na primeira o inseto é transportado por algum animal ou em objetos carregados pelo próprio homem. Essa forma de dispersão está diretamente associada ao estado nutricional e a elevada temperatura. Na segunda, o inseto se desloca por meio do voo ou caminhando (LEHANE, SCHOFIELD, 1981, 1982; WILLIAMS, SCHOFIELD, 1985; LEHANE *et al.*, 1992).

3.3. VIAS DE TRANSMISSÃO DE *T. cruzi*

3.3.1. Vetorial

A transmissão vetorial de *T. cruzi* foi a principal via de transmissão do parasito. Apesar de sua importância, atualmente os padrões epidemiológicos tiveram modificações. Cerca de 80% dos casos da DC existentes foram adquiridas por meio do inseto vetor, ou seja, pela via de transmissão vetorial. Essa via de transmissão varia conforme a capacidade de adaptação do parasito ao domicílio, distribuição dos vetores, grau de antropofilia, ação antrópica no meio ambiente e número de parasitos eliminados nas fezes e urina. Comparativamente a via de transmissão vetorial possui o menor período de incubação (de 5 a 15 dias) do que a via for transfusional (incubação é de 30 a 40 dias), por via oral são cerca de 7 a 22 dias, e pela via transplacentária do quarto ao nono mês de gestação (SILVEIRA, 2000; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2008).

3.3.2. Transfusional

Foi no ano de 1952 que houve a confirmação da transmissão transfusional de *T. cruzi* no Brasil. Até o final da década de 70 eram nas grandes cidades que a maior parte das transfusões de sangue ocorriam. Essa via de transmissão deveu-se a utilização de técnicas rudimentares, com muitos doadores remunerados, sem controle pós-transfusional do paciente e com menos de 20% de testes sorológicos para a DC realizados em doadores. Estima-se que até 1979 eram diagnosticados cerca de 15 mil novos casos da doença por meio da via transfusional (FREITAS *et al.*, 1952; DIAS, 2006b; PIRON *et al.*, 2008).

Na década de 50 notou-se um crescimento da quantidade de análises sorológicas nos doadores na América, mesmo com dificuldades operacionais, assim como a padronização da técnica e o uso da transfusão braço a braço. É importante ressaltar que nessa época a sorologia pré-transfusional não era obrigatória. Somente algumas décadas depois que as técnicas foram aperfeiçoadas dando origem ao teste *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), que atualmente é o método mais usado. Os principais fatores que contribuem para o risco persistente da transmissão da DC por transfusão de sangue estão relacionados com a triagem

sorológica e clínica, a sensibilidade dos testes sorológicos para diagnóstico e a prevalência da doença na região (WENDEL, 2005).

A expansão dos hemocentros em todos os estados e o fim da remuneração para doadores ocorreu na década de 80 com o Programa de Sangue do Ministério da Saúde. Alguns anos depois, vários dispositivos legais definiram a política de segurança do sangue para a transfusão no país, com ferramentas como o Programa de Avaliação Externa de Qualidade (AEQ) em Imunohematologia e Sorologia, o Sistema de Hemovigilância e as Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA. Com a melhoria das condições legais com relação a doação e a criação desses programas, a ocorrência verificada entre a década de 90 até o ano de 2009 de reações sorológicas positivas para *T. cruzi* foi de 0,6% na hemorede pública e 0,7% na hemorede privada (BRASIL, 1998; ANVISA, 2001; WHO, 2002; ANVISA, 2003, ANVISA, 2004; WENDEL, 2005; BRASIL, 2009).

Portanto, entende-se que em áreas endêmicas a transfusão sanguínea é a segunda via mais importante na transmissão da DC (BLEJER, SAGUIER, SALAMONE, 2001).

3.3.3. Vertical, Congênita ou Via Transplantes

A via congênita ou vertical é caracterizada pela transmissão do parasito *T. cruzi* pela placenta, durante a gestação. Nesse processo, observa-se a presença de amastigotas reunidas na placenta que podem ser liberados das células na forma de tripomastigotas sanguíneas, que se adentram na circulação do feto. Esse episódio possui maior frequência de acontecimento entre o quarto e o nono mês de gestação. Entretanto, pode acontecer em qualquer momento da gestação, até mesmo na hora do parto (REY, 2002; BRASIL, 2004; NEVES, 2007).

Em um último levantamento de soroprevalência da DC em áreas rurais do Brasil, demonstrou-se que a taxa de transmissão congênita foi de 0,025%. No entanto, mulheres que já estão gestantes, se contaminadas, não transmite para o feto. Esse fato, não minimiza o tratamento com o Benzonidazol (ROCHE®), que por sua vez tem se mostrado promissor quando utilizado na fase aguda logo após a infecção (PRATA, 2001; OSTERMAYER, 2011).

No exame pré-natal é muito importante a detecção de gestantes chagásicas para garantir o tratamento dos recém nascidos infectados. Estima-se que nas

Américas, a transmissão congênita seja responsável pela ocorrência de 9 a 10 mil novos casos por ano. Além disso, mulheres com DC aguda possuem maior risco de transmissão para o feto do que as mulheres que apresentam a infecção crônica, verificando-se a ocorrência de lesões irreversíveis em recém-nascidos após a transmissão, o que sugere a necessidade da atualização das recomendações no uso de medicamentos tripanossomicidas (SILVEIRA, 2000; PINTO *et al.*, 2011).

Os sistemas de vigilância em saúde possuem um grande desafio em áreas endêmicas quanto ao controle da DC em gestantes e em recém-nascidos durante os períodos de pré-natal e perinatal. Exames parasitológicos diretos devem ser realizados após o parto na mãe e no recém-nascido. Além disso, o monitoramento desses recém-nascidos deve ocorrer até pelo menos os nove meses de idade (BRASIL, 2005; GONTIJO *et al.*, 2009).

Apesar da importância da realização de exames e do monitoramento, o que se verifica é o frequente negligenciamento destas orientações na maioria dos países endêmicos para DC. Dessa forma, a revisão dos protocolos de tratamento medicamentoso, assim como estudos de caso em grávidas com DC é ainda um desafio para o controle da doença (BITTENCOURT, 1984; FARIA , REIS, RABELLO *et al.*, 2013).

Para os transplantes, tem-se um rigoroso controle quanto ao diagnóstico de possíveis doenças infecciosas. Entretanto, alguns erros nesses processos ainda contribuem para a transmissão da doença em regiões endêmicas, principalmente. Nas situações de contaminação que envolve transplantes, se o receptor do transplante apresentou sorologia negativa para a doença e após o transplante passar a apresentar febre, fraqueza e hepatomegalia, com determinação dois meses após o procedimento de *T. cruzi* no sangue, conclui-se que o transplante foi o responsável pela contaminação do paciente receptor (FERRAZ, FIGUEIREDO, 1993; BRASIL, 2004).

A capacitação de recursos humanos assume grande importância como ação de controle para otimizar a qualidade dos diagnósticos laboratoriais, assim como melhorar a sensibilidade clínica na atenção primária (PINTO *et al.*, 2011).

3.3.4. Transmissão Acidental de *T. cruzi* e Biossegurança

Na década de 80 foram mais de 50 episódios de contaminação acidental por *T. cruzi* no Brasil. Esses valores relacionados a episódios de contaminações por acidentes são incertos pela não percepção do ocorrido, pela falta de diagnóstico ou de interesse na propagação ou abertura de números. Pois a ocorrência de situações de contaminação acidental pode significar, na maioria das vezes, falta de segurança, desatenção, iluminação deficiente, aparelhos ou até mesmo falta de quesitos técnicos por parte dos profissionais envolvidos. Há ainda a possibilidade do próprio acidentado, ocultar o ocorrido, pela pouca expressividade dos efeitos agudos dificultando o diagnóstico. Os casos de acidentes geralmente ocorrem em laboratórios de triatomíneos, na captura do vetor em áreas endêmicas, em trabalhos experimentais diversos, contaminação cirúrgica e deficiências de segurança no transporte de materiais infectados (BRENER, 1954; DIAS, 1979; BRENER, ALQUEZAR, LUQUETI, 1997; CHIEFFI, AMATO NETO, 2000; DIAS, 2005).

Para se prevenir os episódios de contaminação acidental, são necessárias análises em duas instâncias, uma primária e outra secundária. A primeira se refere a ações que podem ser tomadas antes da contaminação e já a segunda se refere a prevenção do dano depois do ocorrido. Uma atitude que tem sido tomada pelos centros de pesquisa é a contratação e treinamento de técnicos já contaminados pelo *T. cruzi*, além disso, é imprescindível adotar normas rígidas e adequadas de biossegurança, assim como a utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e realização de procedimentos já padronizados (CHIEFFI, AMATO NETO, 2000).

A nível de monitoramento, é muito importante que as pessoas que trabalham em ambiente com risco de contaminação, façam um teste sorológico no início das atividades, para comparações posteriores em possíveis acidentes (DIAS, 1979).

A instância secundária de prevenção envolve características práticas, onde, quando há suspeita de risco de transmissão deve-se verificar, a ocorrência de ferimento ou contaminação, realizar a desinfecção local com álcool ou outras substâncias antissépticas, verificar a sorologia de controle e iniciar o tratamento medicamentoso. Todos os incidentes devem ser comunicados a uma comissão interna de biossegurança e posteriormente às autoridades sanitárias para prováveis avaliações e correções das falhas referentes aos fatores de risco (BRASIL, 2005).

3.3.5. Transmissão Oral

A transmissão oral de *T. cruzi* é um dos mais importantes e permanentes mecanismos de surtos de micro epidemias no Brasil na atualidade. No entanto, a via de transmissão oral é conhecida desde 1965. Naquele ano, dois surtos foram associados ao consumo de suco de cana de açúcar, onde o período de incubação foi 22 dias, seguindo os dados apresentados na literatura. Também houveram registros relacionados à ocorrência de surtos ocasionados pelo consumo de alimentos em Teutônia (Rio Grande do Sul) e caldo de cana em Catolé do Rocha (Paraíba). Entretanto, até o ano de 2004 a ocorrência de DC aguda por transmissão oral por meio do consumo de alimentos contaminados era pouco divulgado. Em 2005 e 2008 foram relatados surtos de DC por transmissão alimentar em Navegantes-SC e Macaúbas-BA, respectivamente (DA SILVA *et al.*, 1968; SHIKANAI-YASUDA, 1991; BRASIL, 2004; PÉREZ-GUTIÉRREZ, AGRELO, FIGUEROA, 2006; TATTO *et al.*, 2007; ANVISA, 2008; DIAS *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2010). O surto relatado em Santa Catarina envolveu consumo de caldo de cana, com um saldo de 24 pessoas infectadas, com três pessoas que foram a óbito (ANVISA, 2008).

Surtos de DC aguda nos diversos estados do Brasil têm sido assinalados, mais frequentemente na região Norte do país (Tabela 1).

Em 2009 foram divulgados aproximadamente 236 casos de DC aguda no estado do Pará, sendo que a nível nacional, nesse mesmo ano, foram notificados cerca de 256 casos (Tabela 1).

No ano de 2007, ocorreu a divulgação de quatro Notas Técnicas descrevendo casos de surtos que ocorreram na região amazônica e foram verificados pela Secretaria de Vigilância em Saúde. Nos meses de janeiro a outubro de 2007 ocorreram notificações de mais de 100 casos de DC aguda (Tabela 1), com uma letalidade de 4,0%. Esses casos estão relacionados mais frequentemente ao consumo de açaí e aconteceram em 11 municípios da região norte, sendo um município do estado do Amazonas, um município do estado do Amapá e nove municípios do estado do Pará (ANVISA, 2008).

Tabela 1: Casos de DC aguda UF/Brasil no período de 2005 a 2010 – Fonte: Ministério da Saúde - <http://www.fiocruz.br/pidc/media/Doenca%20de%20Chagas%202010.pdf>.

UF	2005	2006	2007	2008	2009	2010	TOTAL
AC	---	---	---	---	01	---	01
AM	---	---	28	---	03	18	49
AP	---	05	19	20	15	---	59
CE	---	08	---	01	---	---	09
BA	---	13	---	---	---	---	13
MA	02	02	02	05	01	---	12
MT	---	01	01	---	---	---	02
PA	07	85	109	99	236	10	546
PI	---	01	01	01	---	---	03
SC	24	---	---	---	---	---	24
SP	---	03	---	---	---	---	03
TO	---	---	01	05	---	---	06
TOTAL	33	118	161	131	256	28	727

Ainda na região amazônica, o primeiro surto de DC aguda registrado foi descrito em 1986 por transmissão oral. Durante os anos de 1968 a 2005, um total de 437 casos de DC aguda foi notificado nessa região. Desses casos, 311 foram relatados para 62 surtos nos quais a forma de contaminação suspeita era pelo consumo de açaí (SHAW, LAINSON, FRAIHA, 1969; VALENTE, VALENTE, PINTO, 2006).

Essa região do Brasil merece destaque pois, a transmissão por via oral, tem grande importância, onde há ocorrências de microepidemias pela ingestão de formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* em alimentos contaminados (CAMANDAROBA, PINHEIRO LIMA, ANDRADE, 2002). Isso se deve ao fato de que o açaí é um dos principais suplementos alimentar da dieta dos habitantes da região

amazônica. Dentre eles destaca-se o estado do Pará. O açaí possui propriedades nutricionais, além do aspecto cultural de consumo do fruto (ROGEZ, 2000).

O açaí (*Euterpe oleracea Mart*) é fruto de uma palmeira da família Aracaceae; típico do Brasil possui distribuição no baixo Amazonas, Maranhão, Tocantins e Amapá, alcançando as Guianas e a Venezuela. A área estimada da presença desta palmeira é de um milhão de hectares. O fruto possui cor roxa, sabor exótico, e é um produto nutracênico, apesar de poucas comprovações a respeito de suas propriedades funcionais e antioxidantes (SOUZA, 1996; BRASIL, 2006).

A extração do açaí é uma atividade realizada tipicamente por meio da agricultura familiar em regiões produtoras, como o estado do Pará, atuando como meio de renda e, exigindo muita habilidade para manejo e colheita dos frutos. De todo o açaí produzido, apenas 20% tem origem de açaizais manejados e cultivados, o restante é obtido por meio do extrativismo. É usado na produção de polpa e bebidas, sendo consumido diariamente pela população amazônica (VALENTE, VALENTE, FRAIHA NETO, 1999; BRASIL, 2006).

Naturalmente essa transmissão, por via oral, já acontece por meio da ingestão, por mamíferos susceptíveis, de vetores e reservatórios infectados. No homem esse tipo de transmissão ocorre, de maneira esporádica e circunstancial, pela ingestão de alimentos contaminados com o parasito. Geralmente isto ocorre quando os triatomíneos são triturados durante o processo de preparo das frutas, ou quando o triatomíneo e suas fezes infectadas são depositadas na superfície de alimentos.

A infecção por via oral também pode ocorrer por ingestão de carne crua ou mal cozida de animais silvestres, ou por meio de hábitos primitivos de ingestão de triatomíneos (VALENTE, VALENTE, FRAIHA NETO, 1999; VALENTE, VALENTE, PINTO, 2002; DIAS, 2006b; OPAS, 2009).

O potencial de contaminação de *T. cruzi* relacionado à infectividade das fezes do triatomíneo está vinculada a umidade do ambiente. Alguns estudos experimentais apontam que o parasito se mantém viável em contaminações com o leite e caldo de cana, por até vinte e quatro horas ou mais (OPAS, 2009). Destaca-se ainda que mesmo com valores de pH extremos no trato gastrointestinal o parasito consegue penetrar através da mucosa intestinal. Essa transmissão pode ocorrer a partir de formas tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas (OPAS, 2009).

A contaminação do açaí por *T. cruzi* está associada à falta de higiene dos manipuladores de alimento durante todas as etapas do processo produtivo. Por esse motivo é necessário cuidados quanto a sanidade dos frutos e materiais empregados no manuseio e preparo. Além disso, deve-se considerar que a falta de Boas Práticas de Fabricação (BPF) no processamento de alimentos, ocasiona o consumo de alimentos contaminados, além da invasão dos *habitats* silvestres que aumentam a proximidade do homem com os vetores e reservatórios do parasito (ciclo silvestre). Também o aumento no número de casos relatados deve-se à melhor caracterização dos surtos e casos da DC devido ao aprimoramento das técnicas de diagnóstico (ROGEZ, 2000; ANVISA, 2008; OPAS, 2009).

Uma das hipóteses para a ocorrência da transmissão oral é que o parasito tenha se mantido ao longo dos anos apenas no ciclo silvestre. Nesse ciclo, os animais se alimentam de pequenos insetos, eventualmente contaminados de maneira natural com *T. cruzi*, promovendo a transmissão oral do parasito. Com a degradação dos ecótopos naturais, o homem facilitou e aproximou os animais silvestres da região domiciliar, participando do ciclo de transmissão como um de seus hospedeiros. Entretanto, diferentemente dos demais animais presentes no ciclo, o homem passou a manifestar clinicamente a DC, tornando a doença uma nova antropozoonose (DIAS, 2006a; COURA, 2007; YOSHIDA, 2007).

A ANVISA, após 2007, elaborou um plano de ação que visa a capacitação de Órgãos de Vigilância Sanitária, da população e dos batedores de açaí. Neste documento observa-se ainda, recomendações da OPAS, que envolvem desde a inclusão da DC como DTA (Doença Transmitida por Alimentos), até a implantação de protocolos eficientes de tratamento térmico, que tem como foco principal eliminar *T. cruzi* do suco de açaí. Além disso, foram promovidos o cadastramento e licenciamento dos estabelecimentos que realizam processamento de açaí, por órgãos de vigilância sanitária. Dessa forma será possível realizar fiscalizações, capacitação dos manipuladores em BPFs, e desenvolver ações educativas, capacitação e mobilização social mediante a realidade da comunidade local (BRASIL, 2008a; BRASIL, 2008b).

É importante que equipes de saúde da atenção primária promovam ações de vigilância que relacionem a população humana, os vetores e reservatórios e a questão ambiental. Além disso, é fundamental que se tenha informações epidemiológicas atualizadas e confiáveis sobre a doença e os agravos, para

posteriores decisões que precisem ser tomadas (OPAS, 2009). É certo que mais estudos são necessários para determinar a viabilidade de *T. cruzi* em açaí e para identificar os focos de contaminação, mas a transmissão por via oral é atualmente uma potencial via de infecção. Como consequência tem provocado aumento da morbimortalidade na forma aguda da doença. Isso se deve ao fato de que o açaí é o maior componente na dieta da região amazônica, local mais atingido pelos surtos, e um componente da economia local, e por esse motivo, identificar práticas e medidas de prevenção é essencial para o controle dessa via de transmissão (ANVISA, 2008; NOBREGA *et al.*, 2009).

3.4. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLÓGICA

A WHO estima que a prevalência de infecção por *T. cruzi* é em torno de 13 milhões de pessoas em 15 países da América Latina, com incidência anual de 200.000 casos. Já no Brasil, com o controle das transmissões vetorial e transfusional, tem-se uma estimativa de que aproximadamente dois a três milhões de pessoas estão infectadas, com prevalência da infecção abaixo de 0,2% (WHO, 2000; WHO, 2002; DIAS, 2006).

No Brasil a prevalência da DC não possui uma homogeneidade quanto a sua distribuição geográfica, sendo aproximadamente 4,2% no meio rural e 2,7% na população em geral. Esse número pode se elevar para 3,2% com a inclusão do estado de São Paulo, conforme um inquérito nacional realizado entre os anos de 1975-1980. Em meados dos anos 70, visando a completa erradicação do vetor que melhor se adaptou aos domicílios, o estado de São Paulo iniciou o combate ativo contra o *T. infestans* com o programa de borrifação de inseticidas em residências onde ele era encontrado. Nos anos 80, esta espécie foi erradicada, propiciando a drástica diminuição da transmissão vetorial. Logo depois, outros estados brasileiros aderiram à campanha de erradicação do *T. infestans* aumentando a eficácia do programa. Os dados atualizados quanto a distribuição dos casos de DC no Brasil até 2010 são representados pela Figura 4 (SCHUMUNIS, 1997; FURUCHO, 2006; TELES, 2013).

No estado do Paraná o *Triatoma infestans* foi encontrado pela última vez em 1991 segundo a FUNASA/PR. SILVEIRA e VINHAES (1998), por sua vez não encontraram espécies de *Panstrongylus megistus* e nem *Triatoma sordida* nos anos

de 1995-1997 no Paraná. Verificou-se que 12,7% das unidades domiciliares rurais no noroeste do Paraná habitadas e desabitadas, estavam infestadas por ninfas e insetos adultos de *Triatoma sordida* e de *Panstrongylus megistus*, e destes cerca de 13,5% destes estavam infectados por *T. cruzi* (ARAÚJO *et al.*, 2004). No inquérito epidemiológico nacional realizado em 1980, observou-se uma prevalência de 4% para DC no estado do Paraná. Após intensa campanha o estado recebeu o certificado de erradicação intradomiciliar no ano de 2005 (CAMARGO, 2007). No entanto, outros vetores ainda se encontram nessa região contendo o parasito, alertando a todos para possíveis novas vias de transmissão, que pode vir a acarretar novas contaminações se as autoridades não continuarem as campanhas e vigilância entomológica constante. É preciso estar sempre em alerta para o risco de outras espécies de triatomíneos tomarem o lugar do *Triatoma infestans* em residências e peridomicílios como vetor principal na transmissão da infecção humana (SILVEIRA, REZENDE, 1994; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2002; KOPP, 2002).

A Amazônia brasileira é considerada área endêmica para DC, devido ao surgimento de casos isolados e pequenos surtos familiares. A Coordenação Estadual do Programa de Controle da doença de Chagas/DCDTV/DVS/SESPA notifica cerca de 130 casos novos e autóctones de DC aguda por ano no estado do Pará (Figura 4) (SOUZA, MONTEIRO, 2013).

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, no ano de 2011 os estados que apresentaram notificações para casos da DC aguda foram: Rondônia (1), Amazônia (12), Pará (113), Amapá (7), Tocantins (15), Maranhão (9), Piauí (1), Rio de Janeiro (1), Mato Grosso do Sul (7), Mato Grosso (1), Goiás (6).

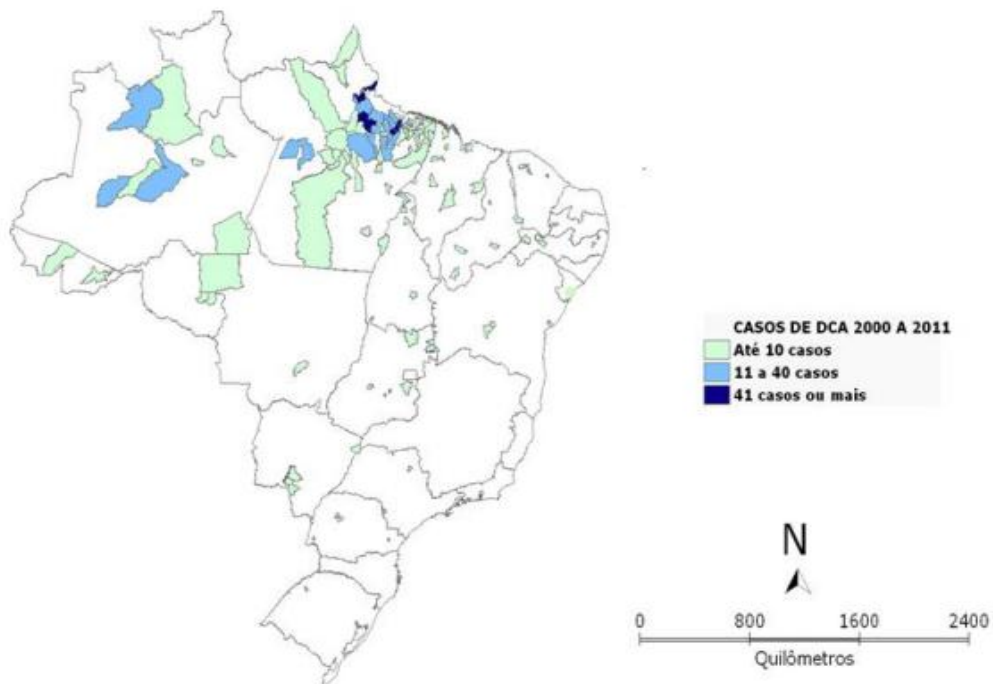


Figura 4: Municípios com casos registrados de doença de Chagas aguda no período de 2000 a 2011. Fonte: Adaptado de TELES, 2013 (SVS/MS).

3.5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da DC pode ser feito a partir de uma suspeita clínica e confirmação com testes laboratoriais, sendo que os principais métodos são:

3.5.1. Exame Clínico

Devido a heterogeneidade populacional do parasito, a patologia se manifesta sob a forma aguda, que evolui posteriormente para uma fase crônica, designada de DC crônica. O exame clínico depende do estágio da doença e da investigação epidemiológica, como a procedência do paciente, se viveu ou visitou áreas endêmicas (LANA; TAFURI, 2005).

A fase aguda da DC tem duração de 6 – 8 semanas e nesse período os pacientes frequentemente apresentam Sinal de Romanã ou do Chagoma de inoculação, acompanhado de febre irregular, adenopatia, hepatoesplenomegalia, taquicardia ou edemas. Além dos sintomas já citados, pode haver linfadenopatia, esplenomegalia e/ou edema. Entretanto, a maioria dos casos são assintomáticos ou oligossintomáticos (LANA; TAFURI, 2005).

Quando a fase aguda termina, a infecção passa a ser silenciosa, do ponto de vista clínico. Nesse momento designa-se essa fase como fase crônica, ou ainda como a forma clínica indeterminada (IZQUIERDO *et al.*, 2013).

Considerando características patológicas e sintomáticas, sabe-se que essa doença parasitária mostra cursos clínicos que variam, desde a apresentação de casos assintomáticos, até estágios crônicos severos da doença. Sabe-se que a maioria dos indivíduos infectados tende a permanecer assintomáticos por toda a vida. Entretanto, cerca de 20 - 35% dos pacientes desenvolvem DC crônica severa por um período de 10 – 30 anos, nos quais se verifica a presença de desordens cardíacas ou gastrointestinais (WHO, 2007; IZQUIERDO *et al.*, 2013).

A regionalidade é um fator determinante na patogênese, forma clínica e severidade da doença, pois indivíduos de diferentes regiões endêmicas são infectados com distintas populações do parasito que podem desempenhar mecanismos distintos no organismo do hospedeiro (MACEDO, PENA, 1998).

Quanto aos recém-nascidos os sintomas mais relevantes são: a hepatoesplenomegalia, distúrbios neurológicos, meningoencefalites, tremores, convulsões, zonas de necrose, edemas generalizados, icterícia, hemorragias cutâneas, cianose, hidrocele, pneumonite, alterações bilaterais de fundo de olho, corioretinite e opacificação do corpo vítreo, chagomas metastáticos, calcificações cerebrais e alterações gastrointestinais originando manifestações digestivas como megacólon e megaesôfago na fase aguda (BITTENCOURT, 1968; PEHRSON, WAHLGREN, BENGTSSON, 1982; BITTENCOURT *et al.*, 1984; ALMEIDA, BARBOSA, 1986). Entretanto, mesmo com sintomas já registrados e que podem permitir a confirmação clínica da DC, o diagnóstico definitivo só é confirmado por meio de diferentes métodos laboratoriais aplicados na fase aguda ou crônica da infecção (LANA; TAFURI, 2005).

3.5.2. Exames Parasitológicos

3.5.2.1. Pesquisa a Fresco de Tripanosomatídeos

Trata-se da primeira medida adotada para a detecção do parasito, por sua rapidez, simplicidade, custo e efetividade. Destaca-se ainda sua maior sensibilidade quando relacionado ao esfregaço corado. Para a realização da técnica o ideal é que

o paciente esteja febril no ato da coleta ou em coleta posterior, de 12 a 24 horas após, de forma que se a primeira pesquisa for negativa e a suspeita clínica persistir, outros testes deverão ser realizados para confirmação dos resultados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A demonstração direta de formas tripomastigotas pelo método a fresco (entre lâmina e lamínula) é em geral positiva nas primeiras semanas da doença. No caso de recém-nascidos o parasito é facilmente encontrado em amostras de sangue, diferentemente do que ocorre na DC adquirida. Alguns parasitos circulantes podem estar presentes ao nascimento, mas via de regra, sempre aparecem entre 10 a 20 dias de vida. O aumento da parasitemia a números máximos ocorre de 1 a 2 meses de vida, para então, lentamente, declinar nos próximos 5 a 8 meses (HOWARD, 1976).

3.5.2.2. Métodos de Concentração de Formas Tripomastigotas

As técnicas de concentração possuem maior sensibilidade e são mais utilizadas quando o teste direto a fresco for negativo. Com apresentação de sintomas por mais de 30 dias, devem ser os métodos de primeira escolha. Os principais métodos de concentração são: *Strout*, microhematócrito e creme leucocitário (*Buffy coat*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Estudos apontam que em análises realizadas em 15 pacientes, em pelo menos 12 o diagnóstico imediato foi realizado pelo método de concentração por microhematócrito, apresentando bons valores se considerado o princípio da técnica. Já o método de *Strout*, mesmo com 95% de sensibilidade e diagnóstico imediato, não é indicado para o uso pediátrico, pois é necessário pelo menos 10 mL de sangue. Sendo, portanto, um fator limitante, embora em adultos possa ser feito sem maiores transtornos. O que se verifica por meio de observações, é que o método a fresco possui menor sensibilidade que o método de *Strout*, detectando-se até 54% das infecções agudas humanas (FREILIJ, MULLER, CAPPA, 1983).

3.5.2.3. Exame de Gota Espessa ou Esfregaço

Essa técnica apresenta sensibilidade inferior aos métodos descritos anteriormente. Entretanto, vem sendo largamente utilizada na região da Amazônia

Legal, por sua praticidade e disponibilidade nas ações de diagnóstico da malária. Sua melhor utilização é nos casos onde os pacientes se encontram na fase aguda da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

3.5.3. Exames Parasitológicos Indiretos

Os principais métodos parasitológicos são o xenodiagnóstico e a hemocultura. A sensibilidade desses métodos depende em grande parte do nível de parasitemia que o indivíduo apresenta no momento da realização do exame. Estes métodos são geralmente utilizados no diagnóstico de pacientes que estão na fase crônica da doença (WHO, 2002).

Especificamente, a realização do xenodiagnóstico é importante nos estágios crônicos da infecção, pois embora a parasitemia seja baixa, os parasitos ainda podem ser demonstrados por esse método. Entretanto, ao passo que a doença se torna crônica, a frequência, e como consequência a sensibilidade do xenodiagnóstico positivo diminui cerca de 40% em 10 anos de evolução. Na fase crônica da DC, resultados positivos no xenodiagnóstico variam entre 30 e 50% dos casos, demonstrando que o tempo de aquisição da infecção aguda está intimamente relacionado com a frequência com que um xenodiagnóstico positivo pode ser obtido (TEIXEIRA, 1987; RASSI, PORTO, REZENDE, 1991).

O xenodiagnóstico é realizado com o uso de ninfas de triatomíneo para sugar sangue de indivíduos suspeitos de serem portadores da doença. Com a finalidade de compreender e verificar qual a melhor espécie que deve ser usada no xenodiagnóstico, estudos comparativos foram realizados com emprego de ninfas de *Panstrongylus megistus* e *T. infestans*. Os resultados mostraram que o *P. megistus* apresentou maior sensibilidade, independentemente de sexo, idade e área de origem (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, MULLER, MOREIRA, 1990; BORGES-PEREIRA *et al.*, 1996; MOREIRA, PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1997).

Além da espécie das ninfas, outro fator fundamental para o possível aumento da positividade do xenodiagnóstico, é a repetitividade dos testes. Estudos mostraram que em pacientes com baixa parasitemia a positividade aumentou de 22,8% para 41,1% quando houve a realização do segundo exame, e quando realizado o terceiro exame, esse número aumentou para 54% (CASTRO, ALVES, MACEDO, 1983).

A utilização das técnicas de xenodiagnóstico tanto *in vivo* quanto "*in vitro*" tem apresentado resultados similares. Porém, pode ocorrer reações alérgicas no braço do paciente devido à aplicação do teste. A melhor aceitabilidade do paciente, facilidade na coleta e restrições em pacientes com lesão de pele e imunodeprimidos, são fatores que motivam a utilização do xenodiagnóstico *in vitro* (SANTOS, SILVA, RASSI, 1995; PINEDA, LUQUETTI, 1998). Apesar das vantagens citadas para o uso do xenodiagnóstico *in vitro*, o emprego rotineiro desse método ainda é muito restrito devido sua sensibilidade e limitações que envolvem o desenvolvimento da técnica tais como: tempo prolongado para o resultado final de até 90 dias, necessidade de criação de triatomíneos em laboratório, perdas dos insetos durante o período de teste e rejeição do paciente às repetições (PORTELA-LINDOSO, SHIKANAI-YASUDA, 2003).

A hemocultura por sua vez apresenta resultados satisfatórios, principalmente quando consideramos os resultados de estudos em vários grupos de pacientes com DC que demonstraram 55,08% de positividade na hemocultura e 27,5% no xenodiagnóstico. Contudo, apesar da superioridade na detecção quanto ao xenodiagnóstico, a hemocultura pode sofrer variações de positividade quanto a vários aspectos como: a idade do paciente, a duração da infecção crônica, o volume de sangue utilizado, a remoção ou não do plasma e o meio de cultura utilizado (CHIARI *et al.*, 1989; GILBER, 2008). Mesmo com os pontos apresentados, a hemocultura vem sendo utilizada como um importante procedimento para o isolamento de cepas para estudos bioquímicos de *T. cruzi*. Portanto, essa técnica tem se mostrado um método indireto relevante na demonstração do parasito no sangue periférico especialmente na fase crônica da infecção (GOEDBLOED, 1976; LUZ *et al.*, 1993).

3.5.4. Exames sorológicos

Os mais variados tipos de provas sorológicas são atualmente utilizados para diagnosticar a DC. São exames efetuados para identificar anticorpos na fase crônica da doença. Os testes mais usados são: Hemoaglutinação Indireta (HAI), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ensaio imuno-enzimático (ELISA) (CAMARGO, 1974; VOLLER, DRAPPER, BIDWELL, *et al.*, 1975; CAMARGO, BATISTA, HOSHINO-

SHIMIZU, 1975; SÁEZ-ALQUÉZAR, LUQUETTI, BORGES-PEREIRA, *et al*, 1997; GILBER, 2008, GOBOR, 2010; GILBER *et al.*, 2013).

Na fase crônica há um predomínio de anticorpo Imunoglobulina G (IgG), de forma que resultados de técnicas clássicas parasitológicas, se utilizadas, apresentam baixa sensibilidade. Por esse motivo as técnicas sorológicas são as mais utilizadas no diagnóstico de DC nessa fase da doença (LUQUETTI, RASSI, 2000).

MACHADO – GUERREIRO (1913) foi responsável pela padronização do primeiro teste baseado na utilização de extratos de órgãos de cães infectados com *T. cruzi* como antígenos. A desvantagem da técnica de Machado-Guerreiro é a ocorrência de muitas reações cruzadas em indivíduos que tinham hanseníase. Em 1947, a hemaglutinação foi empregada utilizando hemácias sensibilizadas com a fração de polissacarídeo extraído do parasito. NEAL e MILES (1970) sensibilizaram hemácias de carneiro com antígenos de culturas de *T. cruzi* e utilizaram. Eritrócitos tratados com cromo e formalina também foram usados, mas apesar dos resultados obtidos, as reações cruzadas com leishmaniose ainda eram um problema. Outros métodos sorológicos com boa sensibilidade e especificidade, tais como os métodos RIFI e ELISA, apareceram com o passar do tempo (MUNIZ, 1947; CAMARGO *et al.*, 1974; PESSOA, 1982).

Os primeiros a padronizar a técnica de RIFI para DC em 1959 foram FIFE e MUSCHEL (1959). Em 1966 a reação de RIFI foi padronizada em lâminas. Em 1974 foi descrito a vantagem da utilização da técnica de RIFI na rotina dos laboratórios clínicos, pela possível distinção da fase aguda ou crônica da doença com a utilização de um conjugado específico para cada fase. Reações cruzadas com leishmaniose também foram verificados (CAMARGO, 1966; CAMARGO *et al.*, 1974).

Na década de 70 o teste ELISA foi padronizado, apresentando uma sensibilidade e especificidade similar ao teste de RIFI. O emprego de antígenos de extrato alcalino em forma epimastigota no método ELISA, se comparado com os antígenos na forma tripomastigota, apresentou resultados com alta sensibilidade, mas com menor especificidade em pacientes crônicos. Por outro lado, vantagens como a realização de muitos pacientes por vez, utilização de um leitor de densidade óptica, dispensando a leitura do técnico na microscopia, fez com que essa técnica se tornasse executável em grande parte dos exames em bancos de sangue, inclusive

na triagem de doadores de sangue (FERREIRA *et al.*, 1991; UMEZAWA *et al.*, 1996; GILBER, 2008, GILBER *et al.*, 2013).

Ensaio imunoenzimáticos tem sido testados com a utilização de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos com diferentes graus de eficiência. Valores de positividade em torno de 98% em chagásicos foram obtidos com o uso de um ou mais de cinco peptídeos sintéticos clonados do antígeno de *T. cruzi*. Em 2001 foi demonstrado que com o uso de quatro peptídeos sintéticos foram obtidos 100% de sensibilidade e 98,9% de especificidade. Índices com 98% de sensibilidade e 100% de especificidade foram registrados com o uso de misturas de antígenos recombinantes (CRA-FRA). O emprego de antígeno recombinante FcaBP alcançou 100% de sensibilidade e especificidade, com seis antígenos recombinantes H49, JL7, A13, B13, JL8 e IF8, a sensibilidade variou de 79 a 100 % e a especificidade de 96,2 a 99,6%. O melhor desempenho isolado de IF8 foi sensibilidade de 99% e especificidade de 99,6% (KRIEGER *et al.*, 1992; VERGARA *et al.*, 1992; PARANHOS-BACALLA *et al.*, 1994; PERALTA *et al.*, 1994; GODSEL *et al.*, 1995; KRAUTZ *et al.*, 1995; UMEZAWA, SILVEIRA, 1999; FERREIRA *et al.*, 2001).

3.5.5. Exames Moleculares

A detecção molecular da infecção por *T. cruzi*, é feita por meio da técnica de PCR. Entretanto, trata-se ainda de uma técnica de uso restrito e realizada em centros com caráter experimental, para que se tenham protocolos definidos e procedimentos operacionais padronizados (POP) para posterior ampla utilização. É uma metodologia de detecção indicada para casos onde o paciente se apresenta na fase crônica da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

3.5.5.1. Reação em cadeia da polimerase - PCR convencional

A técnica da PCR foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, que recebeu, em 1994, o prêmio Nobel. Trata-se de um método diagnóstico que pode ser executado inteiramente *in vitro* sem a utilização de células (MULLIS, 1990; BRUCE *et al.*, 1999). Os primers delimitam a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência DNA (MULLIS, 1990; KANMOGNE *et al.*, 1996; TRUC *et al.*, 1999; KABIRI *et al.*, 1999; KYAMBADDE *et al.*, 2000; PENCHENIER

et al., 2000; RADWANSKA *et al.*, 2002; ZULANTAY *et al.*, 2004). Essa técnica tem se destacado como uma alternativa de maior sensibilidade e especificidade em comparação com as técnicas tradicionais para diagnóstico de doenças infecto-parasitárias. Vários trabalhos vem sendo realizados para a padronização da técnica e uso em DC (BRENIERE *et al.*, 1992; BRITO *et al.*, 1993; GILBER, 2008; GOBOR, 2012; GILBER, ALBAN, GOBOR, *et al.*, 2013). A maioria dos trabalhos vem usando dois pares de iniciadores que amplificam sequências de *T. cruzi* em alvos diferentes, uma sequência de DNA genômico de 188 pb (TCZ1/TCZ2) e do DNA do cinetoplasto de 330 pb (S35/S36), a melhor sensibilidade foi observada para os iniciadores de 188 pb. Esses iniciadores conferiram uma sensibilidade de 5 fg, o que representa menos de um parasito (JUNQUEIRA *et al.*, 1996; KIRCHHOFF *et al.* 1996; LINDOSO, 1998; VIRREIRA *et al.*, 2003, GILBER *et al.*, 2013).

Considerando esse fato, variações dessa técnica foram aperfeiçoadas para melhorar a sensibilidade da PCR. Como exemplo da busca da melhoria da técnica de PCR, vem sendo usada a *nested* PCR, que atua realizando duas amplificações consecutivas do gene alvo. Esta variação da técnica tem se mostrado rápida, bastante sensível e com um limite de detecção aproximado de 0,01 parasito (CRUZ *et al.*, 2002; GILBER *et al.*, 2013).

A técnica de PCR tem como vantagens, alta sensibilidade e especificidade, rápida identificação do parasito quando comparada com os métodos tradicionais de diagnóstico. Essas vantagens fazem da técnica de PCR uma possível ferramenta a ser usada quando os métodos convencionais não forem decisivos para determinação do parasito. Como desvantagem, na fase de pós - PCR pode haver contaminação por amplicons e dar resultados falsos positivos (FREITAS, 2009; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2010).

3.5.5.2. *Real Time* PCR

A técnica *Real Time* PCR representa um marco biotecnológico e um avanço significativo na área de diagnóstico das doenças infecto-parasitárias, que pode resultar em avanços também para a DC. Ela permite a quantificação precisa dos produtos de PCR durante a fase exponencial da amplificação, diferente da PCR clássica, onde a sua quantificação é obtida só no final. A performance da técnica de *Real Time* PCR depende de uma elevada qualidade na extração do DNA, evitando

interferentes que podem inibir a amplificação. Esta técnica é baseada na utilização de sondas fluorescentes com sequências específicas, onde estas hibridizam com a sequência alvo e emitem um sinal fluorescente. O sistema de detecção possibilita a correlação entre a intensidade do sinal com a quantidade do produto amplificado, aumentando assim a precisão e a exatidão do método (HIGUCHI, 1992; HOCHHAUS *et al.*, 2000; KAEDA *et al.*, 2002; YIN, 2002; GABERT *et al.*, 2003; DUFFY *et al.*, 2009; DUFFY *et al.*, 2013). Estas características da *Real Time* PCR permitem a eliminação de uma trabalhosa etapa de pós-amplificação (preparação de eletroforese em gel). Logo, são numerosas as vantagens da PCR quantitativa (qPCR) se comparada a PCR convencional. Pode ser usada ainda para estudos de amostras qualitativas e quantitativas (PIRON *et al.*, 2007).

A técnica de *Real Time* PCR envolve a utilização de fluoróforos. Dois deles (*SYBR*[®] *Green* e *TaqMan*) são amplamente utilizados. O *SYBR*[®] *Green* é uma molécula com propriedade corante que se intercala na fita dupla de DNA. Durante os ciclos consecutivos da PCR, a quantidade de DNA de fita dupla aumenta de modo exponencial, elevando-se, assim, a quantidade de *SYBR*[®] *Green* intercalado e, como consequência, a fluorescência emitida é detectada. Se houver amplificações inespecíficas, estas serão detectadas gerando resultados falsos positivos. Na análise da curva de anelamento obtida, se apenas os produtos específicos foram amplificados, será visualizado um único pico no gráfico. O fácil manuseio e o baixo custo desse fluoróforo são as principais vantagens de sua utilização (ALMEIDA, SADDI, 2007).

Já a sonda *TaqMan* tem sido amplamente empregada e utiliza a atividade exonucleásica 5'-3' da *Taq*[®] DNA polimerase. O processo realiza-se uma vez que essa enzima digere uma sonda marcada, que se anela especificamente na região entre os dois *primers* do seguimento que será amplificado. Essa sonda possui na extremidade 5' uma molécula com propriedades de fluorescência e na extremidade 3' uma molécula fluorescente ou não, mas que possui um comprimento de onda diferente. No sistema *TaqMan*, durante a reação de PCR, a polimerase promove a síntese de novas cadeias de material genético a partir dos *primers* e consequentemente cliva a sonda correspondente, propiciando um aumento do sinal fluorescente. Esse será captado a cada ciclo pelo detector até atingir um limiar, região onde todas as amostras podem ser analisadas (ALMEIDA, SADDI, 2007).

Um dos fatores que apresentam maior limitação para a eficiência da *Real Time* PCR é o desenho dos primers, e este deve ser feito seguindo uma série de regras. Uma característica importante é que os primers devem apresentar temperatura de anelamento (*Melting*) ideal entre 58 e 60°C para garantia da eficiência do ciclo padrão de termociclagem. Se as sequências-alvo forem de DNA complementar (cDNA), preferencialmente os primers devem ser idealizados considerando a região localizada entre dois éxons, dessa forma evita-se a amplificação de DNA genômico em caso de contaminação. Ainda com relação aos primers, deve ser verificada possíveis formações de homodímeros, heterodímeros e de “*hairpin*” (grampo) entre os primers. Para que essas estruturas indesejadas não sejam formadas, deve-se verificar o valor de variação da energia livre de Gibbs (ΔG). Quando o valor de ΔG for positivo, é um indicativo de que há uma menor probabilidade de formação espontânea destes dímeros entre os primers. Além da ΔG , para evitar a formação de dímeros, os produtos de amplificação devem apresentar entre 80 e 150 pares de bases (pb), além disso a quantidade das bases guanina e citosina não pode ser maior que 50% do total de bases nitrogenadas presentes nos primers (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Em geral, a *Real Time* PCR possui três métodos para a determinação da eficiência de amplificação: 1) usando o valor do *slope* obtido pela curva padrão; 2) adequação simples da curva produzida com pelo menos um ponto encaixado quando o *TaqMan* é usado; e 3) analisando a parte linear de um produto exponencial da curva por regressão linear, nesse caso somente quando SYBR® *Green* é usado como detector (HEID *et al.*, 1996; BECKER *et al.*, 2000; RAMAKERS *et al.*, 2003).

Quanto a análise propriamente dita, o *Real Time* PCR permite a realização de quatro tipos de testes, a quantificação absoluta, quantificação relativa, análise de *melting*, e discriminação alélica. A técnica de quantificação absoluta pode ser usada como uma ferramenta de diagnóstico, a fim de detectar infecções, assim como quantificar o agente etiológico. Para a realização da quantificação absoluta utiliza-se a análise de curva padrão (JONHSON *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2006; ROBLEDO *et al.*, 2007; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2009).

Na técnica *Real Time* PCR a curva padrão é obtida a partir de uma diluição seriada de amostras de DNA padrão. Essa curva é um gráfico da concentração de

DNA/DNAc de cada ponto de diluição *versus* os *Cycle Threshold* (Cts) de cada uma. Com esses dados, o *software* calcula a regressão linear, com as quantidades do alvo de DNA em toda a amostra, e constrói uma reta. Por meio da equação da reta é obtido o *slope*, ou inclinação da reta. Esses dados são muito importantes para calcular a eficiência da reação, que é o coeficiente de regressão linear (R^2). O valor de R^2 pode variar entre zero e um, sendo que quanto mais próximo de um maior é o ajuste da reação. Alta eficiência está associada com um *slope* próximo de -3.32. Um *slope* de - 3.32 está relacionado com 100% de eficiência, que indica que o número de moléculas amplificadas dobra com cada ciclo de PCR (TOO, 2003; KUBISTA *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2010).

Além da curva padrão, outro conceito importante na análise dos resultados obtidos por *Real Time* PCR é o *Threshold*. Trata-se do limiar de fluorescência atingido após a etapa de amplificação e aumento constante da emissão até que a mesma atinge um limiar de fluorescência. Os softwares presentes nos equipamentos conseguem traçar esse *Threshold*, embora também pode ser traçado manualmente. Essa linha é traçada em um nível onde todas as curvas de amplificação, de todas as amostras, estão na fase exponencial e bem paralelas. O ponto onde a curva de amplificação é cortada pelo *Threshold* é chamado de Ct ou *Threshold Cycle* (MORTARINO *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2010).

Essas ferramentas moleculares têm colaborado com a superação de limites impostos pelas técnicas de diagnóstico clássicas. Além disso, vários métodos envolvendo a técnica de PCR têm sido aplicados para diagnósticos, monitoramento de terapia em homens e animais, assim como em estudos epidemiológicos (YANG, ROTHMAN, 2004; MARY *et al.*, 2004; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2010; BEM ABDA *et al.*, 2011).

Nesse contexto, a *Real Time* PCR surge como uma inovação tecnológica que permite a quantificação de sequências de DNA de forma mais rápida, precisa, reprodutível e sensível. Dessa forma, o desenvolvimento de uma estratégia de *Real Time* PCR para a quantificação de *T. cruzi* é crucial para oferecer um marcador substituto que avalie desde a eficácia do tratamento, o diagnóstico em pacientes com DC, até quantificação da carga parasitária em tecidos infectados com maior precisão (MARY *et al.*, 2004; PENNISI *et al.*, 2005, FRANCINO *et al.*, 2006; PIRON *et al.*, 2007; VIRREIRA *et al.*, 2007; MANNA *et al.* 2008; DUFFY *et al.*, 2009; PAIVA-CAVALCANTI

et al., 2010, MARTÍNEZ *et al.*, 2011; DUFFY *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2013; RAMPAZZO, *et al.*, 2014; RÉGO *et al.*, 2015; RENDELL *et al.*, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ASPECTOS BIOÉTICOS DA PESQUISA

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética, Processo CONEP nº. 11163 e Registro nº: Doc: CAAE: 0105.0.094.000-10 Protocolo nº 114/2010.

Todos os pacientes foram atendidos por equipe de profissionais de saúde em colaboração com o Sistema Único de Saúde (SUS) e a atenção à saúde do cidadão foi estendida de acordo com a necessidade do caso. A desistência de colaborar com a pesquisa não limitou a atenção à saúde do cidadão.

4.2. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *REAL TIME* PCR

Para a padronização da técnica de *Real Time* PCR várias etapas foram realizadas como: seleção de amostras de cepas de tripanosomatídeos, extração de DNA do parasito, de sangue de pacientes, contatos e de indivíduos controles negativos; titulação dos primers, calibração padrão para detecção de *T. cruzi* e validação da técnica de *Real Time* PCR.

4.2.1. Amostras

4.2.1.1. Culturas de Trypanosomatídeos

Para a padronização da técnica *Real Time* PCR um total de 12 isolados de *T. cruzi*, duas cepas de *T. rangeli* e duas de *Leishmania* foram cultivadas em meio de cultura (*Novy-McNeal-Nicolle* – NNN ou *Liver Infusion Tryptose* -LIT), para posterior extração de DNA e uso para determinação da sensibilidade e a especificidade analítica dos *primers* e da técnica aqui padronizada.

As cepas usadas neste trabalho estão listadas na Tabela 2. As culturas de *T. cruzi* foram isoladas de *Panstrongylus megistus*, de reservatórios silvestres e de humanos. As duas cepas de *T. rangeli* foram cedidas gentilmente pelo doutor Mário Steindel da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo uma isolada em Santa Catarina SC-58 e outra isolada na Colômbia (CHOACHI) de triatomíneos do gênero *Rhodnius*.

Tabela 2: Parasitos utilizados para análise de especificidade dos primers.

Amostras	Hospedeiro - Local	Genótipo
<i>T. cruzi</i>	Vetor	
CUR 90	<i>P. megistus</i> - Paraná	I
CUR 96	<i>P. megistus</i> - Paraná	I
CUR 97	<i>P. megistus</i> - Para	I
CUR 98	<i>P. megistus</i> - Paraná	I e II
	Reservatório	
CUR 29	<i>D. albiventris</i> - PR	I
CUR 45	<i>D. marsupialis</i> -PR	I
CUR 84	<i>D. albiventris</i> - PR	I
	Humano	
HC 3	Humano - MG	TcIIa/TcIIb
HC 27	Humano - PR	TcIIa/TcIIb
HC 45	Humano - PR	TcIIa/TcIIb
CUR 272	Humano – GO	TcIIa/TcIIb
CUR 307	Humano - SC	TcIIa/TcIIb
<i>T. rangeli</i>	SC	A
<i>T. rangeli</i>	Coachi	B
CUR 3	<i>Leishmania enriettii</i>	
LEM 75	<i>Leishmania infantum</i>	

Legenda: I – *T. cruzi* I; II – *T. cruzi* II; TcIIa – *T. cruzi* IIa; TcIIb – *T. cruzi* IIb; A – Linhagem de Santa Catarina e B – Linhagem da Colombia. As cepas e linhagens foram precedentemente identificadas pelo Laboratório de Biologia Molecular do departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná, pela equipe da Professora Vanete Thomaz Soccol.

Para o cultivo das cepas de *Trypanosoma* foi usado o meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) (GILBER, 2008). Para cada cepa 10 tubos de meio foram inoculados com epimastigotas. O conteúdo foi ampliado por repicagens sucessivas a cada semana, por quatro semanas. As culturas foram mantidas em estufa a 27°C. Posteriormente elas foram ampliadas em garrafas de 100 mL para obtenção de maior quantidade de parasito visando à extração do DNA para as etapas de *Real Time* PCR. A biomassa de parasitos obtida e livre de contaminações bacteriana e fúngica foi transferida para tubos *Falcon* de 15 mL e centrifugados durante 10 minutos a 9000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com soro fisiológico a 0,3%. Posteriormente o precipitado foi transferido

para tubos de 2 mL e centrifugados por 5 minutos a 10000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado acrescido de 500 µL de tampão de lise e estocado a -20°C até o momento da extração de DNA.

Para as cepas de *Leishmania* spp. os parasitos foram cultivados em meio bifásico *Novy-McNeal-Nicolle* (NNN), com a fase líquida sendo solução salina fisiológica esterilizada e apirogênica e mantidas em estufa a 24°C. As cepas foram repicadas entre cinco a sete dias para novos tubos contendo meio de cultura. Após a obtenção de seis tubos, ricos em formas promastigotas, 0,5 mL do sobrenadante de cada tubo foram repassados para garrafas de cultura (100 mL) estéreis contendo o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) enriquecido com soro fetal bovino (Gibco, Rockville, Maryland, USA) a 10%. Após a multiplicação dos parasitos, as formas promastigotas foram recuperadas por filtração em gaze esterilizada, seguido de centrifugação a 3.500 g por 10 minutos a 4°C. Foram realizadas lavagens com solução fisiológica 0,9%, 0,3%, 0,9% e tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2, respectivamente, para a eliminação do meio de cultura restante, lise das hemácias e remoção da hemoglobina do coelho. A recuperação das células foi feita por centrifugações a 3.500 g por 10 minutos a 4°C. O *pellet* foi estocado a -20°C até o momento da extração de DNA.

4.2.2. Extração de DNA

O microtubo contendo as formas parasitárias foi submetido ao método clássico de extração de DNA por Fenol – Clorofórmio (SAMBROOK, FROTSCJ, MANIATIS, 1989). Inicialmente foi realizado o descongelamento e submetido a 95°C por 30 minutos por questões de biossegurança e para a lise dos parasitos. Após o aquecimento adicionou-se 600 µL de tampão de lise GEB (hidrocloro de guanidina e EDTA *Buffer*), contendo 6 M de hidrocloro de guanidina (Sigma, St Louis, EUA) e 200 mM de ácido etileno diamino tetracético (EDTA), pH 8,0 (GE) ao tubo e homogeneizou-se em vórtex por um minuto. Em seguida foi adicionado 10 µL de Dodecil Sulfato de Sódio a 10% (SDS) e incubado em banho maria à 37°C por 1 hora. Após este período foi adicionado Proteinase K (20 mg/mL) e incubado à 50°C em banho-maria por 3 horas. Posteriormente foi aquecido a 95°C por 10 minutos

para a desnaturação da proteinase K. Adicionou-se 5 µL de RNase (20 mg/mL) com incubação a 37°C por mais 30 minutos.

Após a incubação, foi adicionado, ao tubo, uma solução de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1), volume à volume, em seguida, homogeneizou-se, gentilmente, por um minuto e foi centrifugado por 10 minutos à 4°C a 14000 g. O sobrenadante foi recolhido com auxílio de uma micropipeta e ponteira cortada (na extremidade) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Repetiu-se o mesmo processo até a limpeza completa das proteínas.

Na sequência, para a precipitação do DNA foram adicionados 45 µL de Acetato de Sódio 3M e em seguida 600 µL de etanol absoluto. Centrifugou por 30 minutos a 14000 g a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi retirado e descartado. Duas lavagens do DNA precipitado foram realizadas com 300 µL de etanol 70% gelado. Para retirada do sobrenadante centrifugou-se a 14000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido foi levado a estufa a 37°C para secagem por 15 minutos. O DNA (sedimento) obtido foi eluído com 100 µL de água ultrapura.

4.2.3. Avaliação e Titulação dos Primers

Inicialmente dois pares de primers já utilizados em PCR convencional padronizada por GILBER, 2008 e GOBOR, 2010, (TCZ1/TCZ2 e S35/S36), foram usados para padronizar a técnica de *Real Time* PCR. Nesta fase foi usada a cepa referência de *T. cruzi* HC27 com uma concentração de 1 ng/µL de DNA, para verificar a amplificação dos fragmentos de DNA por *Real Time* PCR.

Seis pares de iniciadores foram desenhados usando as sequências das cepas referência de *T. cruzi* y152 e Esmeraldo depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para a primeira cepa o número de acesso foi: U89779.1 e para a segunda o código foi: AY785564.1. Para desenho dos nucleotídeos foi usado o *software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems)* por *default*.

Para determinação das temperaturas teóricas de dissociação dos iniciadores, assim como a porcentagem de CG, foi utilizado a ferramenta *OligoCalc* (<http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>).

Após a hidratação dos *primers*, os mesmos foram submetidos ao procedimento de titulação visando otimizar a reação de *Real Time* PCR quanto à melhor concentração a ser usada nas reações. Para este teste, DNA da cepa HC27 foi usado na concentração de 1 ng/μL frente a diferentes concentrações dos pares de primers (100, 200 e 300 nM), para definir a melhor concentração do primer a ser usado na reação.

4.2.3.1. Especificidade Analítica

Foi realizada a técnica de *Real Time* PCR com os primers avaliados e 12 cepas de diferentes parasitos, conforme a Tabela 1, a fim de se verificar se os primers selecionados seriam capazes de amplificar as várias cepas existentes de *Trypanosoma* e *Leishmania*.

4.2.4. Curva de Calibração Padrão para Detecção de *T. cruzi* e Sensibilidade Analítica da Técnica

Para a curva de calibração e avaliação da sensibilidade procedeu-se diluição em série de 10 vezes com água ultrapura do DNA da cepa HC 27 para as seguintes concentrações: 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 e 0,00001 ng/μL. Para determinação das concentrações de DNA das amostras analisadas, essa curva de calibração com as várias concentrações de DNA foram utilizadas durante todo o trabalho.

Todas as reações foram realizadas em triplicata e o volume do tubo de reação foi de 5 μL, sendo que, desse volume 1 μL foi da amostra de DNA molde em diluições seriadas, 1 μL se refere a 200 nM e 300 nM dos oligonucleotídeos TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R, 2,5 μL de 2x SYBR® *Green* PCR-Master Mix (*Applied Biosystems*) e 0,5 μL de água ultra pura (Tabela 3). As leituras foram realizadas no equipamento *StepOnePlus*™ *Real Time* PCR System (*Applied Biosystems*) utilizando a opção 'quantificação absoluta'.

As seguintes condições de amplificação foram usadas: 10 minutos de pré-incubação em 95°C, a amplificação foi realizada durante 50 ciclos (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 60 segundos). A placa foi lida a 60°C, no final de cada ciclo. No final da amplificação foi realizada a Curva de *Melting*, onde foram 95°C por 15

segundos, 60°C por 1 minuto, e finalmente a temperatura se elevou gradativamente em 3°C até atingir 95°C que se manteve por 15 segundos.

Os resultados das curvas de amplificação e dos valores de Ct, que representa o ciclo da PCR no qual o *software* detecta o primeiro aumento significativo de fluorescência acima do sinal de base para determinada amostra, foram analisados através do equipamento.

Tabela 3: Concentração e volume dos reagentes utilizados na *Real Time* PCR.

Componentes	Volumes e concentração (Primers)		
	Bp1F/Bp1R	Ep1F/Ep1R	TCZ1/TCZ2
<i>Syber[®]Green PCR- Master Mix</i>	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
<i>Primers Foward/Reverse</i>	1 µL a 300 nM	1 µL a 300 nM	1 µL a 200nM
<i>Água Ultrapura para PCR</i>	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
<i>DNA molde</i>	1 µL	1 µL	1 µL

4.3. DETECÇÃO DE *T. cruzi* POR REAL TIME PCR EM PACIENTES CRÔNICOS, CONTATOS E CONTROLES NEGATIVOS

4.3.1. População e Local de Estudo

O presente estudo foi conduzido com amostras de pacientes chagásicos em acompanhamento no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba e seus familiares que concordaram em participar voluntariamente da pesquisa. As amostras de sangue foram colhidas por GILBER e colaboradores (2013) e as amostras de DNA foram cedidas pelo grupo de pesquisa da Prof. Dra. Vanete Thomaz Soccol da Universidade Federal do Paraná (GILBER *et al.*, 2013).

Foram investigadas famílias onde pelo menos um indivíduo do casal tenha a infecção chagásica comprovada por testes parasitológicos (culturas) e imunológicos (ELISA e IFI) e PCR convencional (GILBER, 2008; GOBOR, 2010; GILBER *et al.*, 2013). Foram selecionadas 66 amostras de DNA de pacientes procedentes de regiões endêmicas no estado do Paraná, e ainda 11 amostras de indivíduos que tinham relação de parentesco com os pacientes (filhos, netos), denominados contatos.

Como controles negativos amostras de 30 indivíduos que não possuíam nenhum histórico clínico da DC ou diagnóstico para a presença do parasito foram avaliados. Essas amostras de sangue venoso foram coletadas na cidade de São Miguel do Oeste no estado de Santa Catarina em função da oportunidade de obtenção das amostras, e foram utilizadas como pacientes controles negativos na pesquisa.

4.3.2. Extração de DNA de Pacientes Chagásicos Crônicos

Do grupo de indivíduos voluntários chagásicos crônicos, células nucleadas de amostras de sangue foram isoladas em gradiente de Ficoll - PAQUE™ PLUS (Amersham Biosciences AB). Após lavagem com PBS pH 7,4, as células foram submetidas a extração de DNA utilizando o método Fenol x Clorofórmio x Álcool isoamílico (SAMBROOK & RUSSEL, 2011).

Resumidamente, as células nucleadas do sangue foram ressuspensas em tampão de lise (ANEXO 01) e a suspensão foi incubada a 37°C *overnight* na presença de 20 ng/mL de proteinase K. O DNA foi purificado com duas extrações de igual volume de Clorofane, fenol x clorofórmio x álcool isoamílico, na proporção de 25:24:1 e uma extração de igual volume de Clorofil, solução de clorofórmio x álcool isoamílico, na proporção de 24:1. Para a separação da fase orgânica da aquosa, as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 15 minutos. Em cada etapa o sobrenadante foi transferido para novos tubos esterilizados.

O DNA foi precipitado com etanol absoluto gelado e após incubação por uma hora a -80°C o DNA foi recuperado por centrifugação a 12000 g por 15 minutos. O DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado e após seco (15 minutos a 37°C) foi ressuspendido em 500 µL de tampão TE (ANEXO 01) e 1 µL de RNase (20 ng/µL) (Invitrogen). Após incubação à 37°C *overnight* a amostra foi armazenada a -20°C. A quantificação do DNA foi realizada em equipamento nanoview (GE).

4.3.3. Extração de DNA de Indivíduos Controles Negativos

As amostras de sangue de 30 indivíduos, usados como controles negativos, foram submetidas ao processo de extração de DNA com o método de fenol clorofórmio. Inicialmente transferiu-se 1 mL de sangue de cada amostras para

microtubos de 2 mL e centrifugou-se a 14000 g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo células foi ressuscitado com 500 µL de TE (10 mM Tris – HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) e centrifugado a 14000 g por 5 minutos a 4°C. Essa etapa foi repetida mais duas vezes ou o suficiente para se verificar uma menor presença de hemácias nas amostras.

O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuscitado com tampão de lise (50 mM NaCl, 50 mM Tris – HCl pH 7,4, 10 mM EDTA). Adicionou-se ainda SDS a 10% para uma concentração final de 1% e Proteinase K (20 mg/mL) para uma concentração final de 200 µg/mL. Homogeneizou-se gentilmente, por inversão e a amostra foi incubada a 55°C por 1 hora. Após incubação as amostras foram aquecidas a 95°C por 10 minutos para desnaturar a Proteinase K e em seguida foi adicionado RNase (20 mg/mL) para uma concentração final de 200 µg/mL e incubou-se a 37°C por 30 minutos.

Posteriormente foi adicionado igual volume de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1) e agitou-se gentilmente por um minutos seguido de centrifugação a 14000 g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi removido, com o auxílio de uma ponteira cortada, e transferido para novo tubo. Esse processo foi repetido por mais uma vez com Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1), e mais duas vezes com Clorofórmio. O sobrenadante foi recuperado em cada fase após centrifugação 14000 g por 5 minutos a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto a – 20°C, com inversão lenta do tubo para homogeneização. Procedeu-se com a centrifugação a 14000 g por 30 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi retirado e descartado e o DNA foi lavado com 300 µL de etanol 70% a – 20°C. Para remoção do etanol centrifugou-se a 14000 g por 15 minutos a 4°C. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez e em seguida o material foi levado à estufa para secagem a 37°C por 10 minutos. O DNA foi ressuscitado em 100 µL de água ultrapura.

4.3.4. Técnica de *Real Time* PCR para Determinação de *Trypanosoma cruzi* em Amostras de DNA de Pacientes

Para a detecção de DNA do parasito nas amostras foi utilizado um dispositivo *Applied Biosystems StepOnePlus™ Instrument* (*Applied Biosystems*, EUA) que amplificou e detectou a fluorescência emitida pela amostra.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e o volume do tubo de reação foi de 5 µL, conforme o item 5.1.4, utilizando a opção 'quantificação absoluta – curva padrão'.

As seguintes condições de amplificação foram usadas: 10 minutos de pré-incubação em 95°C, a amplificação foi realizada durante 50 ciclos (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 60 segundos). A placa foi lida a 60°C, no final de cada ciclo. No final da amplificação foi realizada a Curva de *Melting*, onde foram 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, e finalmente a temperatura se elevou gradativamente em 3°C até atingir 95°C que se manteve por 15 segundos.

4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Software MedCalc Statistical*, versão 14.8.1 (<https://www.medcalc.org>), para a criação da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e interpretação das correlações entre exames. O desempenho do teste, a nível de precisão, foi avaliado pela área abaixo da curva ROC (AUC – *area under the curve*), de modo que quanto mais próximo de um o valor de AUC estiver, maior é o poder discriminativo do teste. Foi estabelecido três categorias para determinar a precisão da técnica de *Real Time* PCR baseado na AUC-ROC (METZ, 1978; ZWEIG; CAMPBELL, 1993). Essas categorias foram: alta precisão ($0.9 < \text{AUC-ROC} \leq 1$), precisão moderada ($0.7 < \text{AUC-ROC} \leq 0.9$) e, baixa precisão ($0.5 < \text{AUC-ROC} \leq 0.7$). As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi inferior ou igual a 0,05, com intervalo de confiança de 95% (SWETS, 1988).

As correlações entre os métodos diagnósticos foram analisadas por meio do teste de *McNemar* (FAY, 2014).

4.4.1. Estabelecimento de Variáveis Estatísticas Empregando a Curva ROC

Para discriminar o melhor valor de Ct como ponto de corte (*cut off*) que diferencia os resultados positivos e os negativos, foram analisados os valores de Ct apresentado pelos 30 pacientes controles negativos, com clínica e sorologia negativa para DC.

A determinação da sensibilidade e a especificidade do método de *Real Time PCR* com os dois diferentes iniciadores, foi realizada com a análise da curva ROC em todas as 77 amostras, de 66 pacientes e 11 contatos. Os valores de Ct resultantes das curvas de amplificação de cada paciente foram utilizados para a construção da curva ROC.

A curva ROC é uma ferramenta que permite selecionar o ponto de corte de acordo com a especificidade e a sensibilidade, além de medir e especificar problemas no desempenho do diagnóstico em medicina, reduzindo assim a possibilidade de inclusão de amostras que apresentem resultados falso-positivos e falso - negativos (MARGOTTO, 2010).

Para a construção da curva ROC é essencial que seja estabelecido um padrão-ouro que descreva o estado do indivíduo com maior veracidade possível, pois a caracterização das amostras é um fator fundamental para a construção da curva. Nesse trabalho o padrão diagnóstico utilizado para a construção da curva ROC foi o ELISA, conforme o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (BRASIL, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2003).

4.5. MONITORAMENTO DE *Trypanosoma cruzi* EM AMOSTRAS DE AÇAÍ POR CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL

4.5.1. Amostras de Açaí e Contaminação Experimental com *T. cruzi*

Duas amostras de açaí grosso (1 kg) foram adquiridas no mercado do Pará e gentilmente cedidas para a realização deste trabalho pelo Prof. Hervé Rogez (CVACBA). Após o recebimento das amostras, as mesmas foram fracionadas em tubos Falcon de 50 mL. Uma parte dos tubos contendo o açaí foi autoclavada em aparelho de autoclave à 120 °C (1 Kgf/cm²) por 30 minutos e a outra parte foi

armazenada *in natura*. Após o resfriamento das amostras autoclavadas ambas foram armazenadas em freezer -20 °C até o momento da utilização.

Para a contaminação experimental do açaí grosso foi realizada a contagem de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* cepas HC27 e CUR98 obtidas em cultura como descrito no item 4.2.1.1. A contagem foi realizada em câmara de *Newbauer* e em microscópio óptico no aumento de 400X. Após a contagem as amostras foram contaminadas com a realização de 10 contaminações seriadas de 1:10, entretanto apenas 3 diluições de cada cepa foram analisadas, sendo $7,5 \cdot 10^4$, $0,75$ e $7,5 \cdot 10^{-5}$ p/mL para cepa HC27 e $1,9 \cdot 10^4$; $0,19$ e $1,9 \cdot 10^{-5}$ p/mL para a cepa CUR98

Por questões de biossegurança tubos de falcon de 15 mL contendo os parasitos foram levados ao banho-maria a 90 °C por 30 minutos para inativá-los. Após inativação dos parasitos as culturas foram diluídas até obter uma concentração de 10^7 de epimastigotas/tripomastigotas. Em seguida procedeu-se as diluições seriadas de 1:10 e realizada a contaminação experimental desses parasitos nas amostras de açaí (*In natura* e autoclavada) para posterior extração de DNA e análise em *Real Time PCR*.

Duas amostras, sendo uma *in natura* e a outra autoclavada foram preparadas sem contaminação como controle negativo do açaí.

4.5.2. Extração do DNA das Amostras de *T. cruzi* em Açaí

Após a realização da contaminação experimental do açaí, as amostras foram submetidas a técnica de Tríplice Centrifugação para separar o parasito da polpa do açaí. Essa técnica consistiu em três centrifugações sendo que: 1º - a temperatura de 4°C e rotação de 1500 g por 10 minutos. Recuperou-se o sobrenadante e submeteu-se à segunda centrifugação a temperatura de 4°C e rotação de 1500 g por 10 minutos, recuperando-se o sobrenadante. A terceira centrifugação foi realizada a temperatura de 4°C e rotação de 14000 g por 30 minutos. Transferiu-se 1 mL de cada amostra de açaí contaminado para microtubos de 2 mL e centrifugou-se a 14000 g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido com 500 µL de TE. Logo depois foi centrifugado a 14000 g por 5 minutos a 4°C. Essa etapa foi repetida mais duas vezes ou o suficiente para se verificar uma diminuição da coloração característica das amostras.

Depois da última centrifugação o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspendido com tampão de lise. Adicionou-se ainda SDS a 10% para uma concentração final de 1% e Proteinase K (20 mg/mL) para uma concentração final de 200 µg/mL. Misturou-se por inversão e foi incubado a 55°C por 1 hora.

Após a incubação, as amostras foram aquecidas a 95°C por 10 minutos para desnaturar a Proteinase K e logo em seguida foi adicionado RNase (20 mg/mL) para uma concentração final de 200 µg/mL e incubou-se a 37 °C por 30 minutos.

Com o término da incubação, foi adicionado igual volume de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (25:24:1) e agitou-se gentilmente por 5 minutos seguido de centrifugação a 14000 g por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma ponteira cortada e adicionado em um novo tubo. Esse processo foi repetido por mais uma vez com Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (25:24:1), e mais duas vezes com Clorofórmio.

Ao término dessa etapa, foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto a – 20 °C, com inversão lenta do tubo para homogeneização. Procedeu-se com a centrifugação a 14000 g por 30 minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi retirado e descartado e foi adicionado aos tubos 300 µL de etanol 70% a – 20 °C e centrifugou-se a 14000 g por 15 minutos a 4 °C. Esse processo foi repetido por mais uma vez.

O sedimento obtido da etapa anterior foi levado a estufa para secagem a 37 °C. Essa amostra obtida de DNA foi então, depois de seca, ressuspendido em 100 µL de água ultrapura.

4.5.3. Real Time PCR para o Monitoramento do *Trypanosoma cruzi* em Amostras de Açai

Para a realização da determinação de DNA do parasito nas amostras foi utilizado um dispositivo *Applied Biosystems StepOnePlus™ Instrument (Applied Biosystems, EUA)* que amplificou e detectou a fluorescência emitida pelas amostras.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e o volume do tubo de reação foi de 5 µL, conforme o item 4.2.4 (Tabela 3), utilizando a opção 'quantificação absoluta – curva padrão'.

As temperaturas e ciclos utilizados foram: 10 minutos de pré-incubação em 95°C, a amplificação foi realizada durante 50 ciclos (95°C durante 15s, 60°C durante 1 minuto). A placa foi lida a 60°C, no final de cada ciclo. No final da amplificação foi realizada a Curva de dissociação, onde os ciclos foram 95°C por 15s, 60°C por 1 minuto, e finalmente a temperatura se elevou gradativamente em 3°C até atingir 95°C que se manteve por 15s.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *REALTIME* PCR

5.1.1. Região Alvo e Desenho de Primers

A cepa CL Brener Linhagem Ile foi o clone de referência para o projeto genoma de *T. cruzi*, definida como clone híbrido. A cepa Esmeraldo cl3 clone 2 uma cepa comumente utilizada no Brasil, pertence ao grupo TcII, não é um organismo híbrido, pertence ao subgrupo DTU IIb e é encontrado em hospedeiros humanos. Ambas as cepas foram utilizadas com o molde para o desenho de primers a serem usados neste estudo. A escolha dessas cepas deve-se a importância delas no meio científico e ainda por ser uma cepa já estudada geneticamente. A primeira trata-se de clone com cerca de 50% do genoma nuclear formado por sequências repetitivas como retrotransposons, repetições subteloméricas e genes das famílias de moléculas de superfície (EL-SAYED *et al.*, 2005). As sequências repetitivas desse clone possuem vários genes de proteínas ou RNAs que contribuem para formação repetitiva do genoma, apresentando organização em tandem. No genoma de *T. cruzi* estão arranjados em tandem os micro e mini-satélites, os genes de rRNAs, os genes da sequência líder e dos mRNAs de tubulina, amastina, calmodulina, entre outros (BECKMAN e WEBER, 1992; AJIOKA e SWINDLE, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 1994).

Para a cepa CL Brener Linhagem Ile de *T. cruzi* dois pares de primers foram desenhados e para a cepa Esmeraldo cl3 clone2, quatro pares de primers foram escolhidos, nominados e sintetizados (Tabela 2). Eles permitem amplificar sequências do DNA genômico de *T. cruzi*, gene RNA ribossomal em ambos. As temperaturas de dissociação dos iniciadores, obtidas com o uso da ferramenta *OligoCalc*, variaram de 72,4 a 79°C conforme a sequência do oligonucleotídeos delimitado. A porcentagem de CG variou de 47% a 62% (Tabela 4).

Tabela 4: Características teóricas obtidas pelo *OligoCalc* dos fragmentos delimitados pelos primers desenhados em *software* Primer Express para *Real Time* PCR na detecção da infecção por *T. cruzi*.

Primers	Sequência	Tamanho (pb)	%CG	Tm°C
Bp1F/Bp1R	5' TTG GCA TCG CCG TAT CG 3'	60	55%	76,2
	5' CAA TGA CCA ATG AGC CGA AA 3'			
Bp2F/Bp2R	5' ATC ATG GAG CGG TGG TCT CT 3'	60	62%	79,0
	5' TCC TAA AGC CGC CAT CCT T 3'			
Ep1F/Ep1R	5' GTT TTT TAC CCG GCG TCT TTT 3'	54	54%	74,5
	5' GGC CAT CGC TGG CTG AT 3'			
Ep2F/Ep2R	5' TTG ACG AAC AAC TGC CCT ATC A 3'	57	58%	76,8
	5' CGC CAT GGC AGT CCA CTA C 3'			
Ep3F/Ep3R	5' GAC GGA ATG GCA CCA CAA G 3'	57	54%	75,4
	5' TCC CCG TGT TGA GTC AAA TTA A 3'			
Ep4F/Ep4R	5' GCG AAG GCA TTC TTC AAG GA 3'	58	47%	72,4
	5' TTC GAT CCC CAC ACT TTG GT 3'			

Legenda: *Tm* - Temperatura de dissociação

Nas Figuras 5 e 7 são dadas as sequências delimitadas pelos primers desenhados para este estudo, assim como as regiões e a descrição da sequência, sendo que na figura 6 está delimitado o primer TCZ1/TCZ2, também estudado neste trabalho.

Esses dados obtidos foram comparados aos produtos de DNA esperados da reação de *Real Time* PCR na etapa de determinação da especificidade, com a finalidade de confirmar a ocorrência de amplificação dos fragmentos esperados e possibilitar distinção da fluorescência (fluoróforo *SybrGreen*[®]) emitida pela formação de produtos inespecíficos.

Em estudo para o desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de *Trypanosoma* spp., NAZÁRIO, 2012 também usou o *OligoCalc* como ferramenta para analisar as temperaturas de dissociação obtidas nos resultados. Ferramentas presentes na internet devem ser usadas para avaliar as propriedades e características de oligonucleotídeos, colaborando assim para a predição de resultados envolvendo primers (COLEMAN, TSONGALIS, 2006).

```

01 tgcgagtttc cctggggggc ttattgggtg tattgtatt ttaattttt gttgactcgg
61 aggagttttt tgtaattttt ggcacccca aaaaaaattt attggagctt ccggggtttg
121 aaccaaagtg ggcttttta gccgttcgtt ttggttagt aaatcatgga gcgggtggtc
181 ctccgggtgc caagtggcgt cggaaaggatg gcggcttag gatctttaat ttttctcgtt
241 ttttttcgc ggtctttgt ttggcatcgc cgtatcgcgt gtgcggcgca actttctttt
301 cggctcattg gtcattgagg ttttaataa attgattat ttaggtttt ggcctttgc
361 gcaccccgag aatgggaggg attcataatg gtgtgtacat gtgtgtgtg gtcgcacaat
421 ttgtgtgca tgctgtgtc aatgcttatt ttgcgtgctg cgtgtcctg ttgtattcca
481 ctgtgtgtg ttactccatc gtctctccct gccgcgtggg ctgtgcgtaa atttgcttc
541 gcattagcgg aaaataagag gaatcaacgt gttcttttt tttcagaag gggagtcaaa
601 gcgccgtgtg gat

```



Primer Bp2F/Bp2R



Primer Bp1F/Bp1R

Figura 5: Sequência cepa CL Brener Linhagem Ile - Acces number U89779. 1*Trypanosoma cruzi* 18S ribosomal RNA gene, promoter region.

```

1 gagctcctgc ccacacgggt gctgcagtcg gcggatcgtt ttcggcggc tgctgcatca
61 cacgtgtgg tccagatttt tggcgaat tatgaatgt gggagtcaga ggcacactct
121 gtcactacgt gtttgcgtg tcacacactg gacaccaaac aacacctgaac tatccgctgc
181 ttggaggaat atcgc

```



Primer TCZ1/TCZ2

Figura 6: Sequência da cepa de *Trypanosoma cruzi* CanIII – Acess number EU178923.

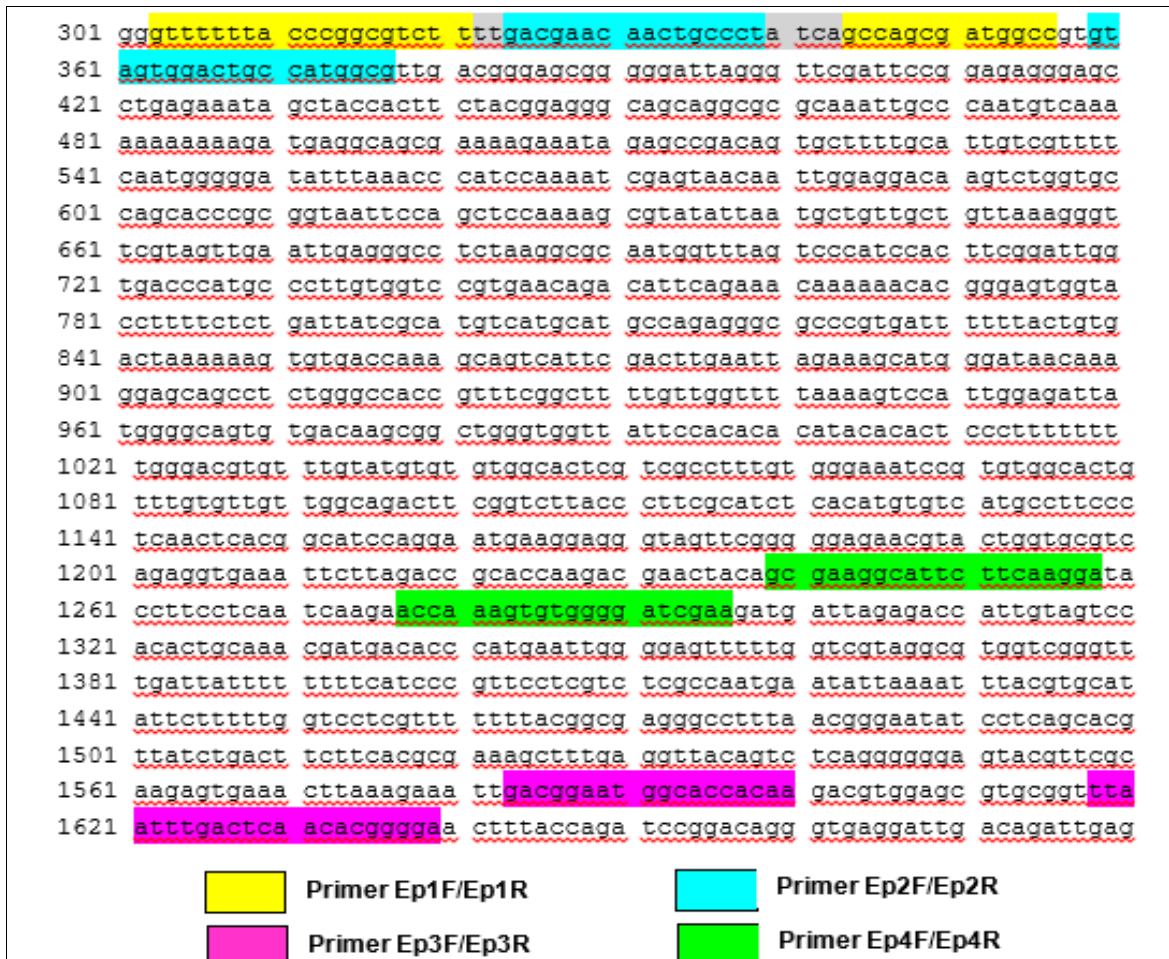


Figura 7: Sequência da cepa de *Trypanosoma cruzi* Esmeraldo CL3 clone 2 18S gene RNA ribossomal, sequência parcial.

5.1.2. Avaliação e Titulação dos Primers

Para os pares de primers TCZ1/TCZ2, S35/S36 numa primeira tentativa de amplificação por *Real Time* PCR sem otimização da concentração de primers e de DNA, usando apenas o programa sugerido pelo fabricante do equipamento, observou-se amplificação para o iniciador TCZ1/TCZ2. Já para o primer S35/S36 não se obteve fragmento de DNA de *T. cruzi* amplificado nas mesmas condições (Figura 8).

O produto de amplificação com iniciador TCZ1/TCZ2 é de 188 pb, apesar de aleatória a curva mostra ter havido reatividade. Já o segundo oligonucleotídeo (S35/S36) que possui como produto um fragmento de 330 pb do kDNA, não foi observada curva indicativa de reatividade. A não amplificação do fragmento pode ser explicada pelo tamanho do mesmo. Em *Real Time* PCR o ideal é não utilizar primers

que originam fragmentos de DNA maiores que 150 pb, pois quanto maior for o fragmento, mais unidades de enzimas e reagentes serão utilizados. Além disso, mais moléculas de pirofosfato são liberadas, de forma que a falta de reagentes e o excesso de pirofosfato podem diminuir a eficiência ou até mesmo inibir a reação e possibilitar a formação de produtos inespecíficos (CARVALHO, RICCI, AFFONSO, 2010). A detecção da sequência do cinetoplasto delimitada pelos iniciadores S35/S36 possui menor sensibilidade que o par de primer TCZ1/TCZ2 (PORTELA-LINDOSO, SHIKANAI-YASUDA, 2003). A partir dos resultados obtidos o primer S35/S36 não foi avaliado nas etapas subsequentes.

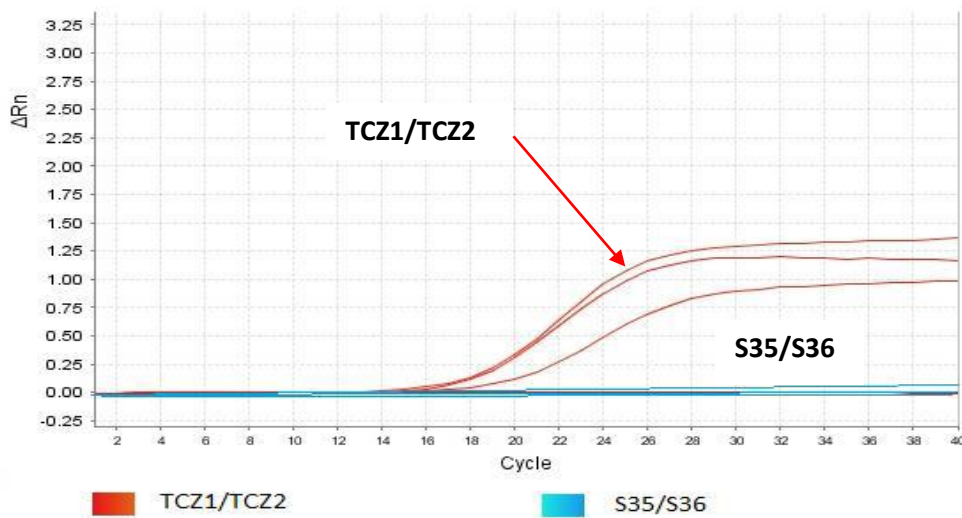


Figura 8: Avaliação da amplificação dos pares de primer TCZ1/TCZ2 (Curva em Vermelho) e S35/S36 (Curva em Azul).

Os primers desenhados para este trabalho foram validados quanto à amplificação ou não com o fluoróforo escolhido frente a cepa HC27 a 1 ng/μL como DNA alvo.

Cinco pares de primers apresentaram amplificação, com valores de Ct entre 32 a 44 para Bp1F/Bp1R, 17 a 29 para Ep1F/Ep1R, 13 a 26 para Ep2F/Ep2R, 12 a 26 para Ep3F/Ep3R e 14 a 24 para Ep4F/Ep4R.

A exceção foi Bp2F/Bp2R que na avaliação inicial não apresentou amplificação para o fragmento esperado. A ausência de amplificação pode ter sido por ação de agentes inibidores ou ainda tempo do ciclo de desnaturação uma vez que o conteúdo CG era de 62% (DEAN, BALLARD, 2001).

5.1.2.1. Determinação da Concentração Ideal de *Primer*

Para o primer TCZ1/TCZ2 foi possível amplificar fragmento de DNA do parasito nas concentrações de primer de 100, 300, 600, 1200 a 2000 nM com concentração padrão de 1 ng/μL de DNA alvo da cepa HC27. Nessa titulação foi identificada que as melhores condições de amplificações ficaram entre 100 e 300 nM.

Nessa etapa de titulação dos primers, para a identificação das melhores concentrações foram considerados alguns parâmetros: a não amplificação dos controles negativos e boa relação Ct e ΔRn .

A concentração ideal de primer deve gerar o menor Ct possível com um maior valor de ΔRn , sem a presença de dímeros, mesmo nos controles negativos (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

Para a definição do ponto ótimo da concentração de primers foram analisados pontos intermediários (100, 150 e 200 nM) de TCZ1/TCZ2. Como resultado, a melhor concentração foi 200 nM, pela não formação de dímeros, e pela relação Ct e ΔRn (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados da primeira titulação dos primers nas concentrações 100, 300, 600, 1200 e 2000 nM.

TCZ1/TCZ2 (nM)	100	200	300	600	1200	2000
<i>Ct</i>	19,0	17,3	10,7	10,3	9,8	9,7
ΔRn	1	1,5	1,5	1,6	1,7	1,7
<i>Controle Negativo</i>	NEG	NEG	INDET	POS	POS	POS

Legenda: NEG – Sem amplificação; INDET – Uma das duplicatas com amplificação; POS – Com amplificação.

A titulação dos primers desenhados no presente estudo mostrou amplificação de DNA de *T. cruzi* para cinco pares de primers nas concentrações de 100, 200 e 300 nM e concentração fixa de DNA em 1 ng/μL. O primer Bp2F/Bp2R não teve amplificação do fragmento esperado de *T. cruzi* em nenhuma das concentrações avaliadas.

Dos primers que amplificaram o fragmento esperado verificou-se que a melhor concentração de primer foi de 300 nM (Tabela 6). Entretanto, os elevados

valores de Ct para o primer Bp1F/Bp1R, sugere uma amplificação tardia do fragmento alvo.

Os dados obtidos no presente trabalho corroboram com o de BECKER *et al.*, 2004 que avaliaram o *Real Time* PCR para detecção de *T. brucei* em amostras de sangue humano, e utilizaram a concentração de 300 nM como ideal para amplificação específica do fragmento alvo. A concentração de 350 nM, valor próximo ao obtido por esse trabalho, foi considerado ótimo no estudo de CALDAS *et al.*, 2012 para detecção de *T. cruzi* em amostras de sangue e tecido.

Os primers foram testados com controles negativos (indivíduos não infectados e sem histórico clínico da doença) para verificar a possível formação ou não de dímeros de primers ou de produtos inespecíficos. Os dados obtidos evidenciaram que os melhores primers para prosseguir com as análises seriam: TCZ1/TCZ2, Bp1F/Bp1R e Ep1F/Ep1R. Pois Bp1F/Bp1R e Ep1F/Ep1R foram os únicos primers que não amplificaram as amostras de indivíduos controles negativos e o TCZ1/TCZ2 foi selecionado por sua importância no meio científico (Tabela 7).

Tabela 6: Resultado da titulação dos 6 primers em diferentes concentrações (100, 200 e 300 nM) quanto a ocorrência de amplificação para cepa de *T. cruzi*.

<i>Primers/Concentração</i>	<i>100 nM</i>	<i>200 nM</i>	<i>300 nM</i>
Bp1F/Bp1R	Negativo	Positivo	Positivo
<i>Ct</i>	***	45,4	38,3
ΔRn	***	0,2	0,7
<i>Controle Neg.</i>	Negativo	Negativo	Negativo
Bp2F/Bp2R	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Ct</i>	***	***	***
ΔRn	***	***	***
<i>Controle Neg.</i>	Negativo	Negativo	Negativo
Ep1F/Ep1R	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Ct</i>	33,1	26,18	22,01
ΔRn	0,32	0,67	1,22
<i>Controle Neg.</i>	Negativo	Negativo	Negativo
Ep2F/Ep2R	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Ct</i>	27,5	18,6	17,5
ΔRn	0,2	0,87	0,85
<i>Controle Neg.</i>	Negativo	Negativo	Negativo
Ep3F/Ep3R	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Ct</i>	25,3	16,4	15,5
ΔRn	0,25	0,85	1,50
<i>Controle Neg.</i>	Negativo	Negativo	Negativo
Ep4F/Ep4R	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Ct</i>	28,3	19,7	17,8
ΔRn	0,22	1,00	1,47
<i>Controle Neg.</i>	Negativo	Negativo	Negativo

Tabela 7: Resultados dos primers testados com pool de amostras de sangue de indivíduos controles negativos.

Primer	Controle Negativo	Ct
TCZ1/TCZ2	POS	33,0
Bp1F/Bp1R	NEG	---
Bp2F/Bp2R	POS	41.9
Ep1F/Ep1R	NEG	---
Ep2F/Ep2R	POS	42.6
Ep3F/Ep3R	POS	33.5
Ep4F/Ep4R	POS	43.9

Legenda: NEG – Sem amplificação; POS – Com amplificação.

Desde os anos 90 o par de primer TCZ1/TCZ2 vem sendo usado com sucesso por diferentes pesquisadores. LINDOSO, 1998 mostrou que esse primer reconheceu com maior frequência os tripanossomatídeos examinados em comparação com o primer S35/S36. PORTELA-LINDOSO e SHIKANAI-YASUDA, 2003 verificaram sensibilidade de 5 fentograma (fg) de *T. cruzi*, o equivalente a 0,022 moléculas por parasito em amostras de sangue e que portanto viabilizaria a utilização. GILBER *et al.*, 2014 demonstraram em PCR convencional a capacidade de detecção de um único parasito em amostra sanguínea de pacientes com DC crônica.

5.1.2.2. Especificidade Analítica

A partir dos resultados da etapa anterior foram selecionados os primers: TCZ1/TCZ2, Ep1F/Ep1R e Bp1F/Bp1R, mesmo esse último apresentando elevados valores de Ct. Os mesmos foram avaliados frente a cepas de *T. cruzi* pertencente a diferentes genótipos, *T. rangeli* e *Leishmania* (Figuras 9A e B; Figura 10A e B). Nessa análise verificou-se que os iniciadores TCZ1/TCZ2 permitiram amplificar fragmento esperado (188 bp) para todas as cepas (Figura 9), demonstrando não ser específico para *T. cruzi*. O par de primer Ep1F/Ep1R também amplificou DNA de todas as cepas avaliadas de *T. cruzi* e *T. rangeli*, sem no entanto amplificar DNA de *Leishmania*. Esse comportamento pode ser explicado pela sequência de DNA

delimitada por estes primers, que poderiam ser comum a esses kinetoplastidas. O par de primers Bp1F/Bp1R apresentou uma amplificação restrita (Figura 10). Se analisarmos o primer Bp1F/Bp1R descrito e estudado nesse trabalho, o mesmo se mostrou promissor, pois é específico para *T. cruzi* e não amplificou DNA de *Leishmania* sp. e de *T. rangeli coachi* (Tabela 8).

As reações cruzadas, que indicam inespecificidade de primers ao se ligarem em regiões do DNA que não é o alvo da análise, foram verificadas em primers como Bp1/Bp2 com *T. rangeli* cepa SC, demonstrando a carência de iniciadores para a detecção de *T. cruzi* com elevada especificidade (SILBER *et al.*, 1996). Em estudo de especificidade realizado por LINDOSO, 1998 observou-se amplificação de cepas de *T. rangeli*, *L. mexicana* e *L. chagasi* com os iniciadores TCZ1/TCZ2. GILBER, 2008, verificou amplificação para *T. cruzi*, *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *Trypanosoma rangeli*, corroborando os resultados encontrados no presente trabalho. No entanto, outros autores mostram especificidade para o par de primer TCZ1/TCZ2 em PCR convencional (VIRREIRA *et al.*, 2003; MELO, 2010).

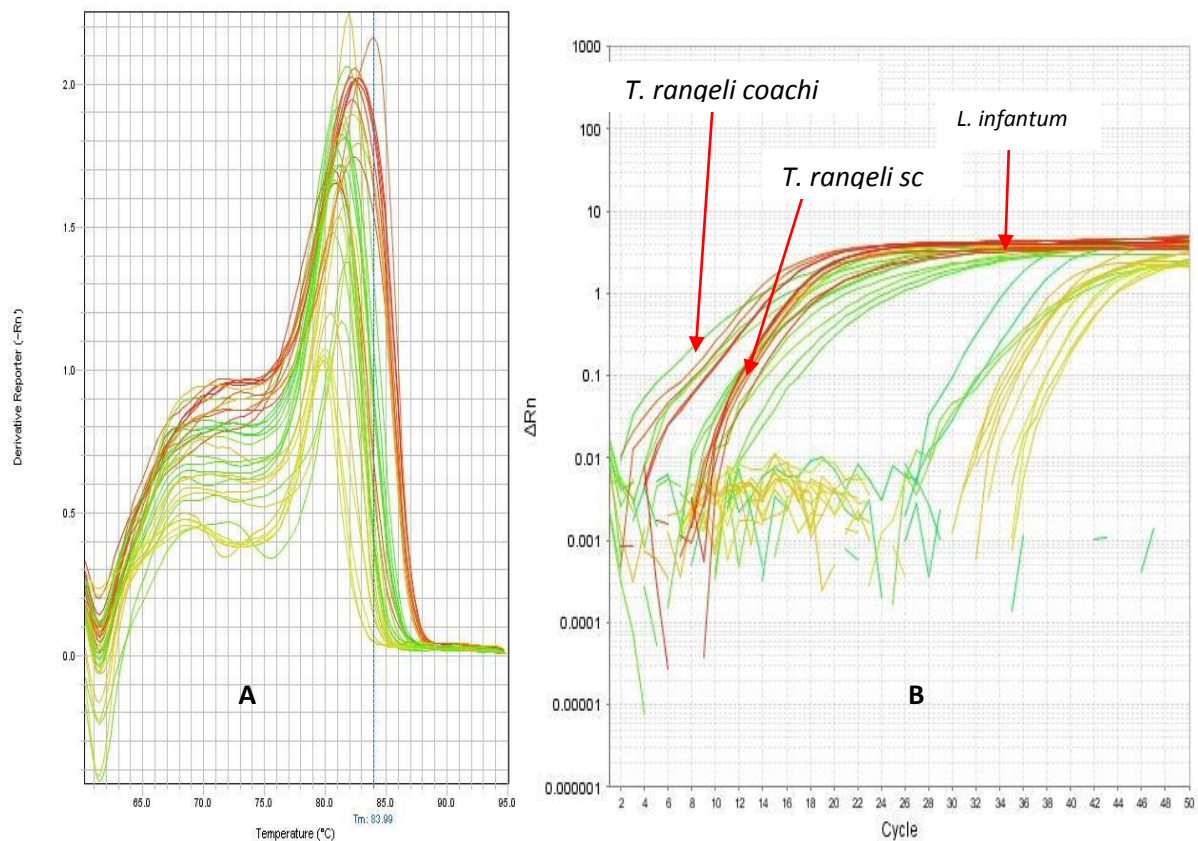


Figura 9: Curvas de melting (A) e curva de amplificação (B) para o primer TCZ1/TCZ2 obtidas com o DNA de várias cepas de *T. cruzi*, *T. rangeli* e *Leishmania* na concentração de 1 ng/μL de DNA.

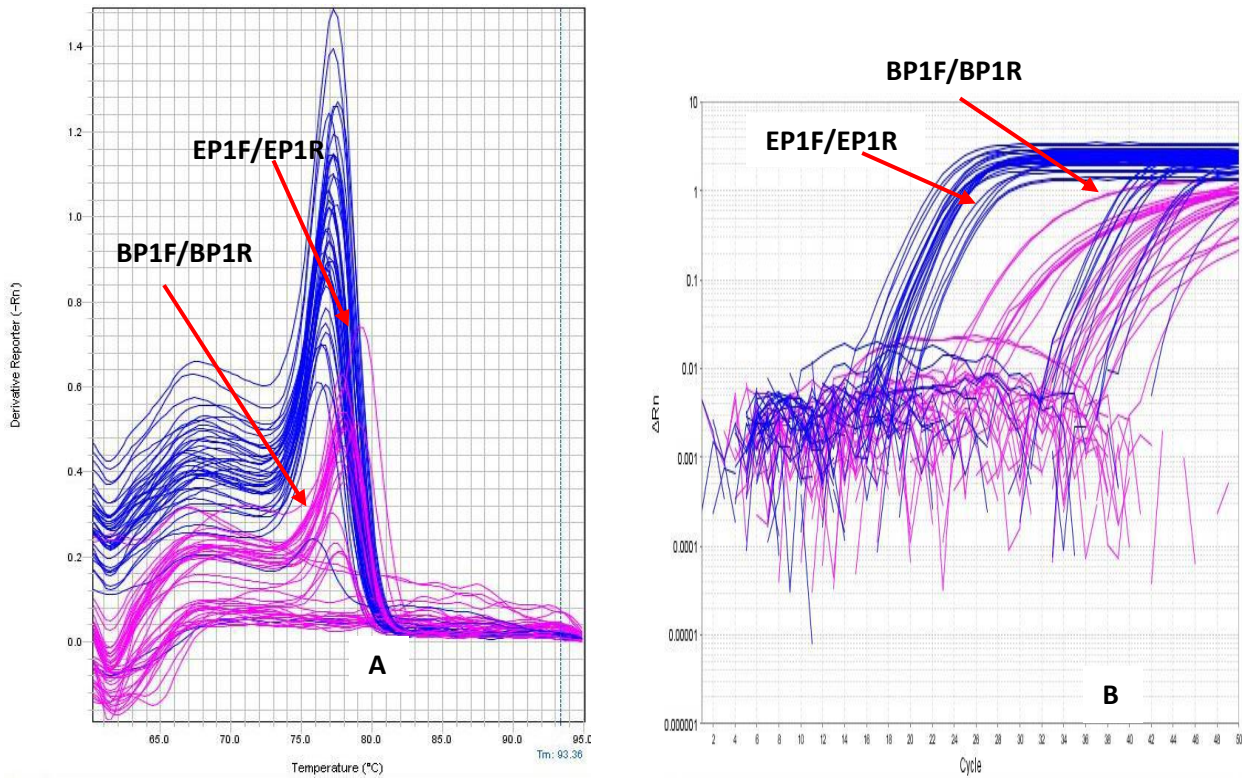


Figura 10: Curvas de melting (A) e curva de amplificação (B) para os primers EP1F/EP1R e BP1F/BP1R obtidas com o DNA de várias cepas de *T. cruzi*, *T. rangeli* e *Leishmania* concentração de 1 ng/μL de DNA.

Tabela 8: Avaliação da especificidade dos primers selecionados submetidos a cepas variadas e os respectivos valores de Ct em amostras positivas.

CEPAS	VALORES DE CT		
	<i>Bp1F/Bp1R</i>	<i>Ep1F/Ep1R</i>	<i>TCZ1/TCZ2</i>
CUR 90	35,87	22,85	10,57
CUR 96	37,92	21,74	9,84
CUR 97	36,26	21,34	5,08
CUR 29	39,15	23,66	9,76
CUR 45	40,1	22,61	9,76
CUR 84	36,01	23,47	8,94
HC 3	26,98	21,98	9,66
HC 27	39,17	21,13	24,5
HC 45	30,84	20,46	12,69
CUR 272	42,27	24,34	28,12
CUR 307	30,69	21,44	7,43
<i>T. rangeli sc</i>	29,86	21,37	8,71
<i>T. rangeli coachi</i>	Negativo	19,29	4,33
CUR 3	Negativo	41,67	32,15
LEM 75	Negativo	40,95	27,92

Os valores da temperatura da Curva de *Dissociação* em amostras positivas para TCZ1/TCZ2 variaram entre 80,14 °C a 87,54 °C, E1F/Ep1R entre 76,59 °C a 77,48 °C e Bp1F/Bp1R entre 77,41 °C a 79,12 °C (Tabela 9). Em todos os casos as temperaturas de dissociação obtidas são semelhantes às calculadas com recurso ao programa *OligoCalc* para cada um dos primers (Tabela 4), de forma que esse parâmetro pode ser utilizado para confirmar a ocorrência de amplificação do fragmento esperado ou ainda distinguir a fluorescência emitida pela formação de produtos inespecíficos.

O DNA das cepas de *Leishmania* e de *T. rangeli* cepa *coachi* que não foram amplificadas pelo primer Bp1F/Bp1R, apresentaram as temperaturas de *melting* (T_m): 85,16 °C (CUR3), 82,70°C (LEM75) e 74,06°C, respectivamente. Essas temperaturas estão fora do intervalo obtido entre as temperaturas de dissociação para esse primer, com uma diferença considerável entre os valores. Os valores de C_t em amostras positivas verificados para esse par de primer são valores caracteristicamente elevados (Tabelas 6 e 8), entretanto um estudo com as cepas que apresentaram valores de C_t inferiores a 39,17 (HC27) se faz necessário, para assim, viabilizar a utilização desse primer para detecção de outras cepas.

NAZÁRIO, 2012 utilizou essa mesma ferramenta para diferenciar 4 espécies (*T. grayi*, *T. brucei*, *T. congolense* e *T. vivax*) com base nas temperaturas de dissociação obtidas por *Real Time* PCR com primers Tryp18S, que se ligam em regiões dos genes 18S das diferentes espécies de *Trypanosoma*. As temperaturas de dissociação encontradas na prática pelo autor foram semelhantes às obtidas com recurso ao programa *OligoCalc*. Portanto, pode-se afirmar que os dados teóricos obtidos foram compatíveis com os visualizados na prática nesse trabalho.

Muitos dados já foram comparados com a prática e publicados de maneira a concordar com a metodologia empregada pelo *OligoCalc* para a determinação das temperaturas de dissociação teóricas de sequências de oligonucleotídeos (PANJKOVICH, MELO, 2005).

Tabela 9: Resultados das temperaturas de dissociação dos primers selecionados submetidos a cepas variadas.

	BP1F/BP1R	EP1F/EP1R	TCZ1/TCZ2
CEPAS	Valores de T_m (°C)		
CUR 90	77,78	76,67	80,80
CUR 96	77,93	77,03	81,99
CUR 97	78,08	76,82	87,54
CUR 29	77,71	76,59	82,65
CUR 45	77,41	77,12	81,59
CUR 84	78,23	76,67	81,69
<i>T. rangeli sc</i>	77,93	77,11	81,17
HC 3	77,93	76,89	82,49
HC 27	79,12	77,48	83,24
HC 45	78,23	76,89	80,14
CUR 272	77,56	76,82	81,55
CUR 307	78,01	77,18	81,14
CUR 3	***	76,74	81,25
<i>T. rangeli coachi</i>	***	77,33	81,47
LEM 75	***	77,04	81,32

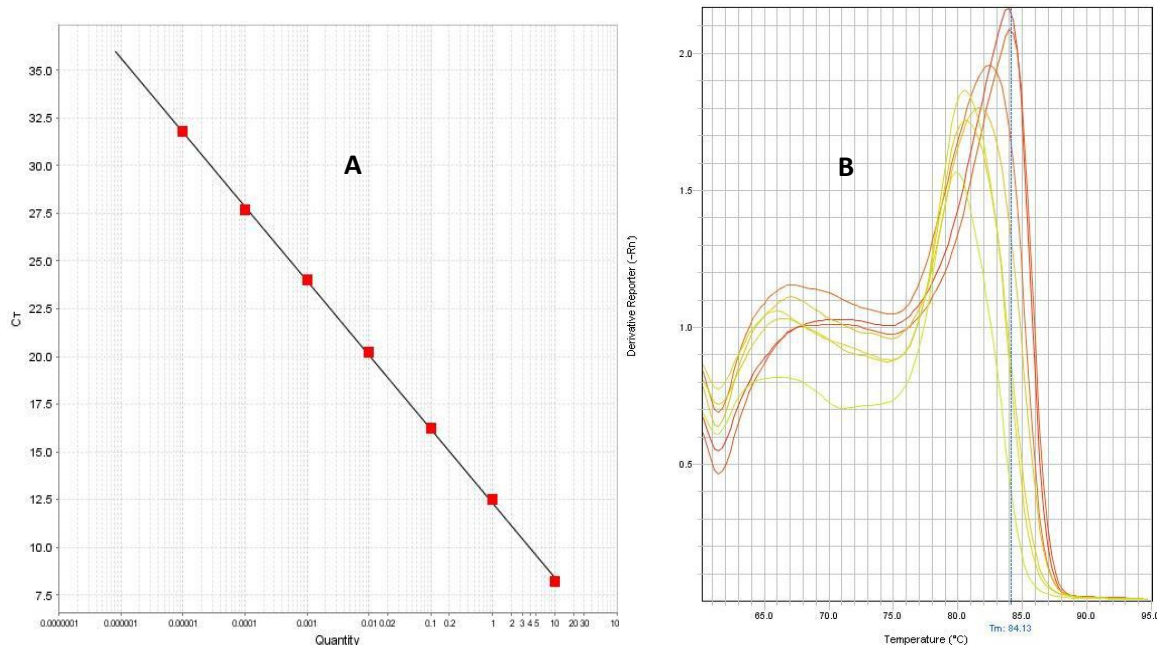
5.1.3. Curva de Calibração Padrão para Detecção de *T. cruzi* e Verificação da Sensibilidade Analítica

Dados referentes à padronização da técnica de *Real Time* PCR para a quantificação de *T. cruzi*, e verificação da sensibilidade utilizando os iniciadores TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R em amostras de DNA da cepa HC27, uma vez que Bp1F/Bp1R apresentou amplificação tardia o teste não incluiu o mesmo, são dados nas Figuras 11 e 12 e Tabela 10.

Nas curvas de amplificação para os iniciadores TCZ1/TCZ2 (Figura 11C) obtidas por diluição seriada em 7x na proporção de 1:10 do DNA do parasito (10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 e 0,00001 ng/ μ L), a linha *Threshold* intercepta a curva em escala logarítmica de amplificação em 0,336556. A partir da curva de amplificação, tem-se a curva padrão, em destaque na Figura 11A, com eficiência de 80,823%, valor de correlação linear (R^2) = 0,995 e o *slope* foi de -3,887. Na Figura 11B, observa-se a superposição das curvas de dissociação em um único pico de 84,13 °C.

A sensibilidade analítica do ensaio realizado com o primer TCZ1/TCZ2 foi verificada por meio das diluições seriadas (1:10) descrito anteriormente (Figura 11A). O limite mínimo para detecção de parasitemia observado foi de 0,00001 ng/ μ L (10 fg/ μ L) de DNA do parasito, o equivalente a 0,044 moléculas do parasito, pois segundo MELO, 2010, um único parasito contém aproximadamente 300 fg de DNA, entretanto, analisando os resultados apresentados, observa-se que mais diluições poderiam ter sido realizadas, tendo em vista que a última diluição foi amplificada ainda em Cts baixos, aumentando ainda mais a sensibilidade analítica da técnica.

Em PCR convencionais realizadas com os iniciadores TCZ1/TCZ2, LINDOSO, 1998 obteve sensibilidade de até 5 fg de *T. cruzi*, que equivale a aproximadamente 0,022 moléculas do parasito. Esse mesmo autor verificou ainda que à medida que a concentração de DNA humano aumentava a sensibilidade de detecção do DNA do parasito diminuía. MELO, 2010 trabalhando com PCR convencional detectou limite de 10^{-1} parasitos, o que significa 30 fg de DNA de *T. cruzi* misturado em sangue, evidenciando que em função do valor encontrado nesse estudo (10 fg/ μ L), a técnica de *Real Time* PCR realizada possui maior sensibilidade analítica. Já SCHIJMAN *et al.*, 2011, utilizando o sistema TaqMan *Real Time* PCR, com a utilização do primer TCZ1/TCZ2, obtiveram os valores de 0,1 fg/ μ L para o genótipo I de *T. cruzi* e 1 fg/ μ L para o genótipo IV como limites de detecção. O valor da correlação linear encontrada na reação de *Real Time* PCR com os iniciadores TCZ-F/TCZ-R realizada por CALDAS *et al.*, 2012 foi de $R^2 = 0,997$, com um valor de temperatura de dissociação de 81°C. Esses valores são semelhantes aos encontrados no presente estudo.



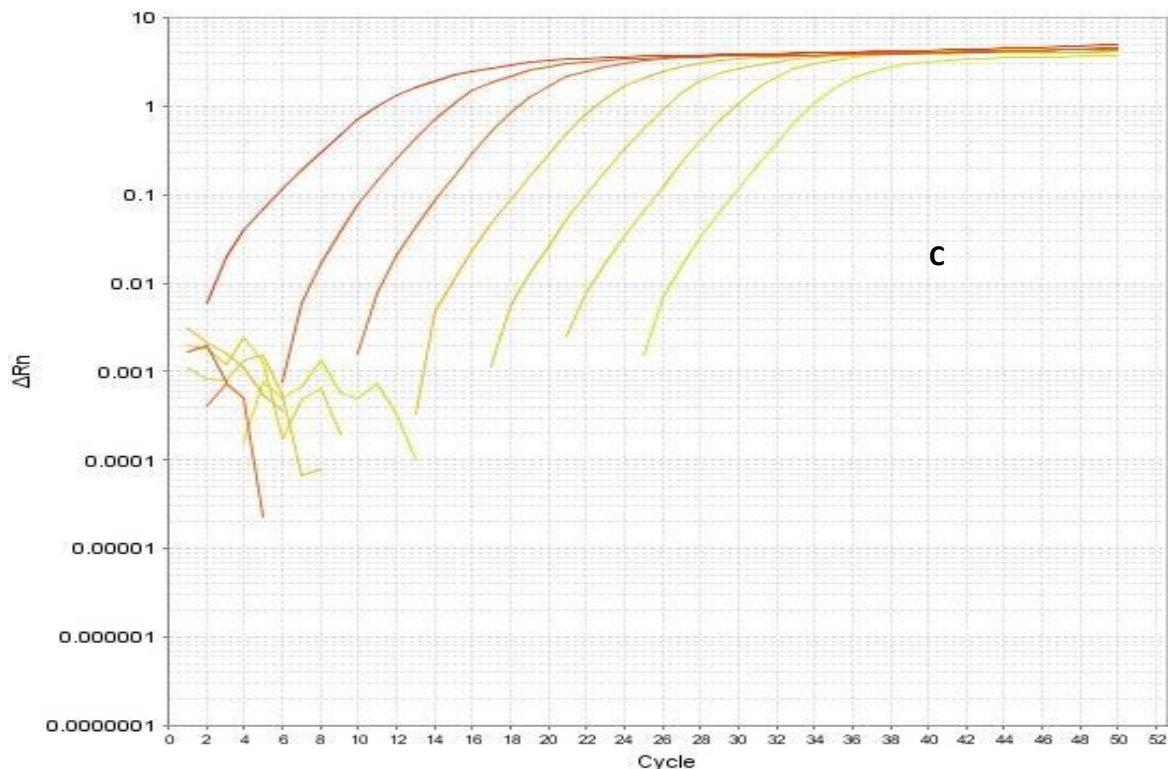


Figura 11: Curva padrão para o primer TCZ1/TCZ2 gerada a partir da região linear de cada amplificação com as diluições seriadas 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 e 0,00001 ng/ μ L de DNA da cepa HC27 (A); Curva de *melting* com as diferentes concentrações de DNA da curva de calibração (B); Curva de amplificação com as 7 diluições seriadas com diferentes concentrações de DNA da curva de calibração (C);

As curvas de amplificação para os iniciadores Ep1F/Ep1R (Figura 12C) foram obtidas por diluição seriada em 6x na proporção de 1:10 do DNA do parasito (1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 e 0,00001 ng/ μ L). A partir da curva de amplificação, tem-se a curva padrão, em destaque na Figura 12A, com eficiência de 85,49%, valor de correlação linear (R^2) = 0,969 e o *slope* foi de -3,727. Na Figura 12B, observa-se a superposição das curvas de dissociação em um único pico de 78°C. O limite de detecção de parasitemia observado foi de 0,0001 ng/ μ L de DNA aplicado na técnica em questão, o equivalente a 0,44 moléculas do parasito. TOO, 2003 verificou a sensibilidade do ensaio pela análise da amplificação da amostra com maior diluição do DNA alvo quando comparado à formação de dímeros de *primers* em amostras sem DNA. No presente estudo, a sensibilidade analítica realizado com o primer Ep1F/Ep1R também foi verificada por meio das diluições seriadas (1:10) descrito anteriormente (Figura 12A), de modo que a possível formação dos dímeros foram identificadas pela curva de dissociação.

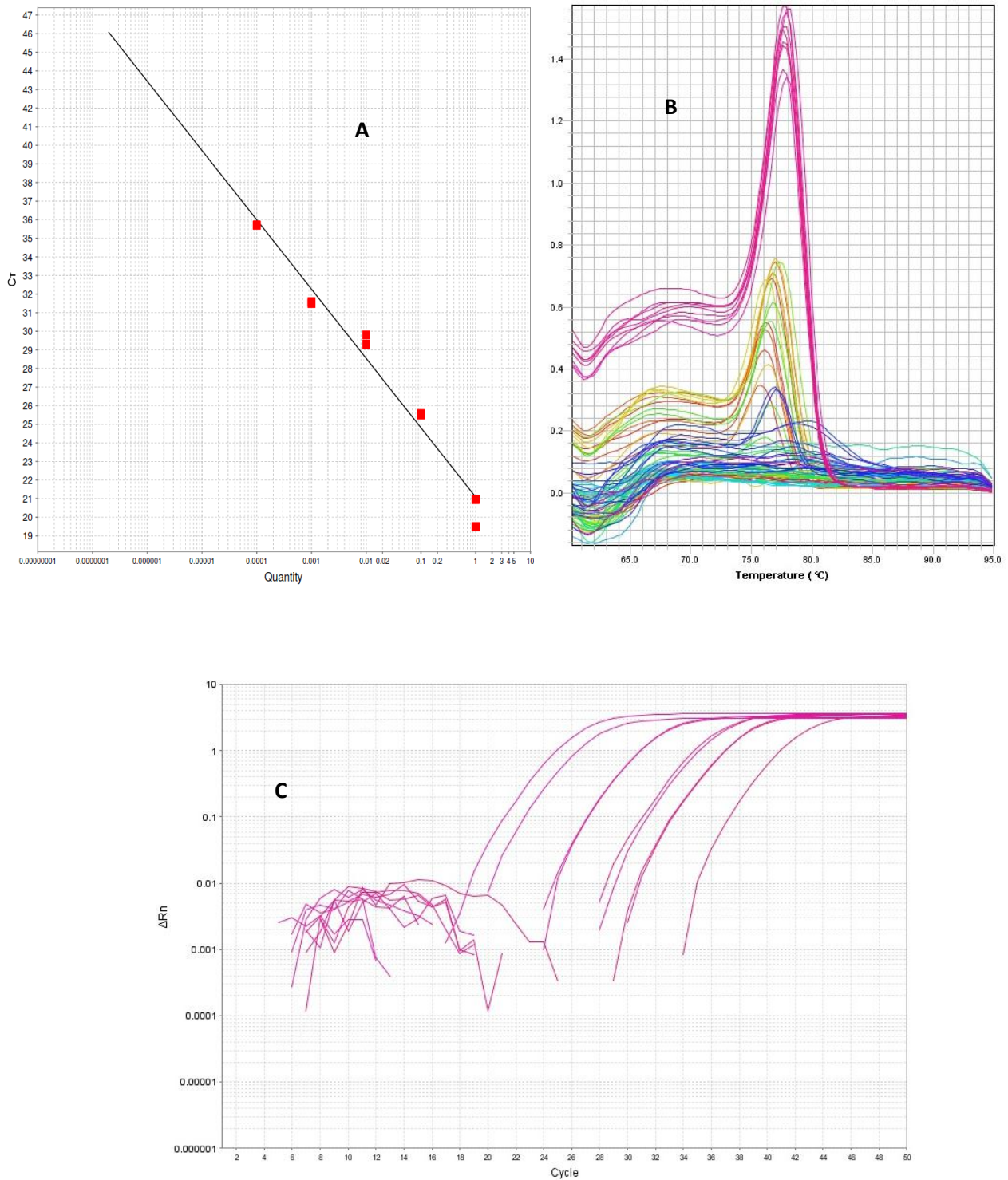


Figura 12: Curva padrão para o primer Ep1F/Ep1R gerada a partir da região linear de cada amplificação com as diluições seriadas 1, 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001 ng/μL de DNA da cepa HC27 (A); Curva de *melting* com as diferentes concentrações de DNA da curva de calibração (B); Curva de amplificação com as 5 diluições seriadas com diferentes concentrações de DNA da curva de calibração (C);

Tabela 10: Média dos valores de Cts em triplicatas para os primers TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R em cada ponto de concentração da curva padrão.

	TCZ1/TCZ2	Ep1F/Ep1R
	Ct	Ct
10 ng/μL	8,074	---
1 ng/μL	12,245	20,22
0,1 ng/μL	16,288	25,53
0,01 ng/μL	20,313	29,54
0,001 ng/μL	24,559	31,54
0,0001 ng/μL	27,698	35,70
0,00001 ng/μL	31,296	---

5.2. VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE *REAL TIME* PCR COM OS PRIMERS TCZ1/TCZ2 E EP1F/EP1R EM PACIENTES CRÔNICOS E CONTATOS

5.2.1. Amostragem

Ao todo foram analisadas 107 amostras de DNA extraído de sangue, sendo 66 de pacientes com diagnóstico clínico da DC, 11 indivíduos que tinham relação de parentesco com os pacientes (filhos, netos), denominados contatos e 30 de indivíduos sem sinais clínicos e que não tenham vivido em zona endêmica.

5.2.2. Análises estatísticas

5.2.2.1. Estabelecimento de Variáveis Estatísticas Empregando a Curva ROC

O ponto de corte estipulado para a identificação de amostras verdadeiramente positivas foram valores de Ct menores ou iguais a 34,7 para o par de primer TCZ1/TCZ2 e de valores de Ct maiores que zero para o par primer Ep1F/Ep1R (Gráfico 1 e 2). Segundo TOO, 2003 valores de Cts superiores a 35 poderiam indicar resultados falso-positivos. No entanto, dados de Ct podem variar de acordo com a concentração de DNA de parasito presente na amostra. Pacientes com DC crônica

podem ter parasitemia baixa e conseqüentemente podem apresentar valores de Ct mais elevados.

O índice de sensibilidade foi de 79,2% e especificidade de 69,8% para o teste de *Real Time* PCR com o primer TCZ1/TCZ2 (Gráfico 1) e para o primer Ep1F/Ep1R a sensibilidade foi de 71,7% e especificidade de 76,7% (Gráfico 2). SCHIJMAN *et al.*, 2011 usando *Real Time* PCR com primer TCZ e sonda *TaqMan*, e sorologia como padrão ouro, obtiveram sensibilidade de 63% e especificidade de 100%. No presente trabalho a sensibilidade foi superior (76,4%) para esse par de primer. BUA *et al.*, 2012 em estudo sobre a transmissão vertical de DC obtiveram carga parasitária igual a 0,14 eP/mL, sensibilidade de 100%, especificidade de 75,4%, como o melhor valor de *cut-off* para determinar e identificar paciente infectado com *T. cruzi*. O valor de especificidade encontrado no presente estudo, com o uso dos iniciadores Ep1F/Ep1R, foi superior ao relatado por esse autor (Tabela 11).

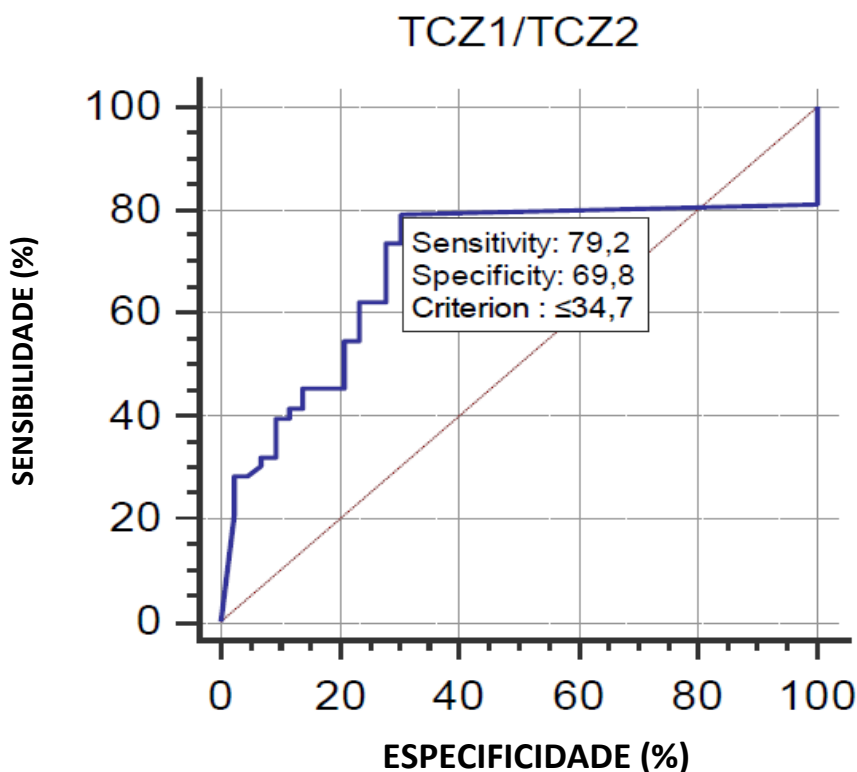


Gráfico 1: Estabelecimento do ponto de corte pela curva ROC, utilizando o iniciador TCZ1/TCZ2 em amostras de pacientes.

Legenda: Critério – Intervalo de valores de Ct utilizado como *cutoff*, para definição de amostras positivas.

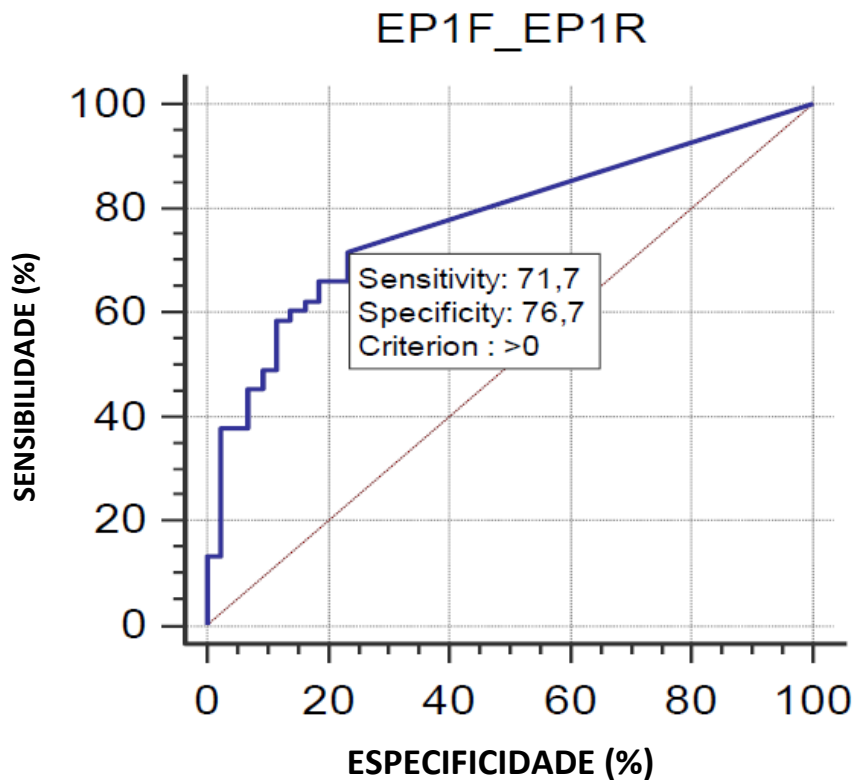


Gráfico 2: Estabelecimento do ponto de corte pela curva ROC, utilizando o iniciador Ep1F/Ep1R em amostras de pacientes.

Legenda: Critério – Intervalo de valores de Ct utilizado como *cutoff*, para definição de amostras positivas

A determinação do poder diagnóstico do método proposto pela análise da AUC evidencia valores de 69,2% para área sob a curva para do primer TCZ1/TCZ2 e de 77,4% para Ep1F/Ep1R, com um nível de significância de 95%. A AUC para Ep1F/Ep1R é estatisticamente significativa, demonstrando a relevância do primer descrito nesse estudo para o diagnóstico de *T. cruzi* (Tabela 11). Quanto maior o valor de AUC, maior área no gráfico, e conseqüentemente o classificador tem melhor desempenho. Quando os primers avaliados são comparados, com relação ao sistema de classificação proposto por SWETS, 1988, nota-se que o primer Ep1F/Ep1R apresentou uma média precisão ($0,7 < \text{AUC-ROC} \leq 0,9$), já TCZ1/TCZ2 apresentou uma baixa precisão ($0,5 < \text{AUC-ROC} \leq 0,7$). BUA *et al.*, 2012 utilizando os primers Sat Fw (59-GCAGTCGGCKGATCGTTTTTCG- 39) e Sat Rv (59-TTCAGRGTTGTTTGGTGTCCAGTG-39) para monitoramento da carga parasitária para DC, e obtiveram uma AUC = 0,812, que por sua vez também se enquadra

como um sistema de média precisão, assim como a AUC apresentadas nesse estudo com o primer Ep1F/Ep1R (SILVA, 2006; DUFFY, BISIO, ALTCHER *et al.*, 2009).

Tabela 11: Comparação dos dados das curvas ROC dos primers TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R.

	AUC	Valor de P	Ponto de Corte	Sensibilidade	Especificidade
TCZ1/TCZ2	0,692	= 0,001	≤34,7	79,2%	69,8%
Ep1F/Ep1R	0,774	<0,001	>0	71,7%	76,7%

Legenda: AUC – Área abaixo da curva; P – significância estatística.

5.2.2.2. Comparação de Metodologias com o *Real Time* PCR para o Diagnóstico de *T. cruzi* em Pacientes

A análise do Diagrama de Pontos Interativo mostra o ponto de corte entre os pacientes definidos como positivos e negativos para cada par de primer (Gráfico 3). É facilmente perceptível que o par de iniciadores Ep1F/Ep1R tem melhor poder discriminatório enquanto que para os iniciadores TCZ1/TCZ2 o limiar de discriminação é baixo.

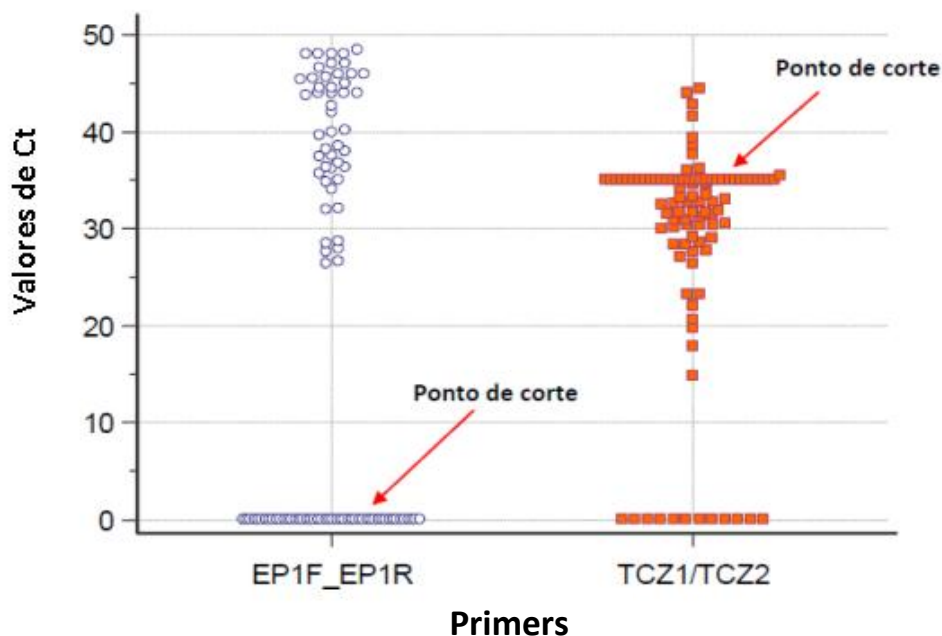


Gráfico 3: Gráfico de múltiplas variáveis dos iniciadores TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R em amostras de pacientes.

Legenda: Ponto de corte – Limite entre as amostras consideradas positivas e negativas.

As demais comparações da técnica de *Real Time* PCR com testes sorológicos e PCR convencional serão evidenciadas com a utilização do Teste de *McNemar* para tratamento dos dados, que tem como característica ser aplicável aos experimentos do tipo "antes e depois" em que cada sujeito é utilizado como seu próprio controle e a medida é efetuada em escala nominal ou ordinal (FAY, 2014).

O par de primer TCZ1/TCZ2 quando comparado com o método RIFI apresentou relevante discordância nos resultados (Tabela 12). A significância estatística foi de $P = 0,0311$ para o intervalo de confiança de 5%, onde a diferença entre a prevalência dos dois métodos foi de 19,70%. Quando os resultados de *Real Time* PCR com oligonucleotídeo TCZ1/TCZ2 foram comparados ao teste ELISA, com diferença da prevalência dos métodos de 15,15% e PCR convencional com diferença de 1,52%, a diferença detectada não foi significativa estatisticamente (Quadro 14).

Para os iniciadores Ep1F/Ep1R quando comparado com o método IFI o mesmo apresentou diferença significativa, com $P = 0,0227$ para um intervalo de confiança de 5%, e diferença entre a prevalência dos dois métodos de 18,18% (Tabela 13). Os resultados obtidos para Ep1F/Ep1R não apresentaram discordância significativa e quando comparados aos métodos de ELISA, com diferença da prevalência dos métodos 13,64% e PCR convencional com diferença de 1,52% (Quadro 14).

Os valores de significância estatística identificado na comparação entre a técnica *Real Time* PCR com TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R e a RIFI, não significam que exista uma forte associação ou grande eficácia por parte da técnica de RIFI, que apresentou maior positividade e discordância. Mas apenas que existe uma forte evidência de que o efeito observado não seja decorrente do acaso, isto é, a probabilidade de que este resultado tenha sido obtido por uma casualidade é menor que 5% (COUTINHO, CUNHA, 2005). Portanto, é importante destacar que os resultados de discordância de *Real Time* PCR com as técnicas de ELISA e PCR convencional, mesmo sendo resultados que não são estatisticamente significativos, não devem ser interpretados como evidência de ausência de efeito da intervenção, mas sim de que as evidências contra a hipótese nula são fracas, ou que esses métodos possuem resultados com baixa discordância (COUTINHO, CUNHA, 2005).

Tabela 12: Concordância entre os resultados do método *Real Time* PCR com o primer TCZ1/TCZ2 em relação aos testes RIFI, ELISA e PCR convencional em amostras de 66 pacientes usando o Teste de *McNemar*.

Real Time PCR TCZ1/TCZ2				Real Time PCR TCZ1/TCZ2			
ELISA	Pos.	Neg.		RIFI	Pos.	Neg.	
Pos.	31	22	80,3%	Pos.	34	22	84,8%
Neg.	12	1	19,7%	Neg.	9	1	15,2%
	65,2%	34,8%			65,2%	34,8%	

Real Time PCR TCZ1/TCZ2			
PCR	Pos.	Neg.	
Pos.	31	13	66,7%
Neg.	12	10	33,3%
	65,2%	34,8%	

Tabela 13: Concordância entre os resultados do método *Real Time* PCR com o primer Ep1F/Ep1R em relação aos testes RIFI, ELISA e PCR convencional em amostras de 66 pacientes usando o Teste de *McNemar*.

Real Time PCR Ep1F/Ep1R				Real Time PCR EP1F/EP1R			
ELISA	Pos.	Neg.		RIFI	Pos.	Neg.	
Pos.	38	17	83,3%	Pos.	40	18	87,9%
Neg.	8	3	16,7%	Neg.	6	2	12,1%
	69,7%	30,3%			69,7%	30,3%	

Real Time PCR Ep1F/Ep1R			
PCR	Pos.	Neg.	
Pos.	31	14	68,2%
Neg.	15	6	31,8%
	69,7%	30,3%	

Tabela 14: Resultados da análise de discordância com o teste de *McNemar* para *Real Time* PCR com os primers TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R.

	<i>Real Time</i> PCR			
	TCZ1/TCZ2 - Diferença	Ep1F/Ep1R - Diferença	TCZ1/TCZ2 - P	Ep1F/Ep1R - P
ELISA	15,15%	13,64%	0,1227	0,1078
RIFI	19,70%	18,18%	0,0311	0,0227
PCRc	1,52%	1,52%	1,00	1,00

Legenda: Diferença – Diferença entre a prevalência dos métodos; P – Valor de significância estatística, PCRc - PCR convencional.

Quanto a positividade dos 66 pacientes, para os iniciadores TCZ1/TCZ2 foi de 65,15%, e para os iniciadores Ep1F/Ep1R foi de 72,72%, o que mostra superioridade na detecção quando comparado ao primeiro primer (Tabela 15). Quanto aos demais métodos apresentados o que demonstrou maior positividade foi a RIFI (84,84%) seguido do ELISA (80,30%). Já o PCR convencional apresentou positividade de 66,66% (ANEXO 2).

Tabela 15: Positividade (%) de 66 amostras de sangue de pacientes avaliadas por *Real Time* PCR com os iniciadores TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R, ELISA, RIFI e PCRc – TCZ1/TCZ2.

	<i>Real Time</i>		ELISA	RIFI	PCRc TCZ1/TCZ2
	TCZ1/TCZ2	Ep1F/Ep1R			
<i>Positividade</i>	65,15%	72,72%	80,30%	84,84%	66,66%
<i>Total (N)</i>	66	66	66	66	66

Legenda: Positividade – Número de pacientes positivos; N – Número total de pacientes da amostragem. PCRc - PCR convencional

5.2.2.3. Comparação de Metodologias com o *Real Time* PCR para o Diagnóstico de *T. cruzi* em Indivíduos Contatos

A análise dos resultados discordantes pelo teste de *McNemar* (Tabela 17) revelou que, o par de primers TCZ1/TCZ2 quando comparado com os métodos ELISA ($P = 1,00$), RIFI ($P = 0,625$) e PCR convencional ($0,2188$) não apresentou relevante significância estatística para um intervalo de confiança de 5% (Tabela 16).

Já análise dos resultados discordantes (Tabela 18) dos iniciadores Ep1F/Ep1R quando comparado com o método ELISA apresentou relevante significância estatística de $P = 0,0156$ para um intervalo de confiança de 5%, com uma diferença entre a prevalência dos dois métodos de 63,64%. Quando comparado com o método RIFI verificou-se grande significância estatística ($P = 0,0078$) para um intervalo de confiança de 5%, com uma diferença entre a prevalência dos dois métodos de 72,73%. Os resultados de Ep1F/Ep1R não apresentaram significância estatística quando comparados os métodos de PCR convencional (Tabela 16).

Tabela 16: Resultados da análise de concordância com o teste de *McNemar* para *Real Time* PCR com os primers TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R em amostras de indivíduos contatos.

	<i>Real Time</i> PCR			
	TCZ1/TCZ2 - Diferença	Ep1F/Ep1R - Diferença	TCZ1/TCZ2 - P	Ep1F/Ep1R - P
ELISA	9,09%	63,64%	1,00	0,0156
RIFI	18,18%	72,73%	0,6250	0,0078
PCRc	36,36%	18,18%	0,2188	0,6875

Legenda: Diferença – Diferença entre a prevalência dos métodos; P – Valor de significância estatística; PCRc = PCR convencional.

Tabela 17: Concordância entre os resultados do método *Real Time* PCR com o primer TCZ1/TCZ2 em relação aos testes RIFI, ELISA e PCR convencional em amostras de contatos usando o Teste de *McNemar*.

Real Time PCR TCZ1/TCZ2				Real Time PCR TCZ1/TCZ2			
ELISA	Pos.	Neg.		RIFI	Pos.	Neg.	
Pos.	0	2	18,2%	Pos.	0	1	9,1%
Neg.	3	6	81,8%	Neg.	3	7	90,9%
	27,3%	72,7%			27,3%	72,7%	

Real Time PCR TCZ1/TCZ2			
PCR	Pos.	Neg.	
Pos.	2	5	63,6%
Neg.	1	3	36,4%
	27,3%	72,7%	

Tabela 18: Concordância entre os resultados do método *Real Time* PCR Ep1F/Ep1R com RIFI, ELISA e PCRc em amostras de contatos, pelo Teste de *McNemar*.

Real Time PCR Ep1F/Ep1R				Real Time PCR Ep1F/Ep1R			
ELISA	Pos.	Neg.		RIFI	Pos.	Neg.	
Pos.	2	0	18,2%	Pos.	1	0	9,1%
Neg.	7	2	81,8%	Neg.	8	2	90,9%
	81,8%	18,2%			81,8%	18,2%	

Real Time PCR Ep1F/Ep1R			
PCR	Pos.	Neg.	
Pos.	5	2	63,6%
Neg.	4	0	36,4%
	81,8%	18,2%	

Quanto a positividade dos 11 indivíduos contatos (Tabela 19) o iniciador TCZ1/TCZ2 apresentou 27,27%, já o primer Ep1F/Ep1R demonstrou 72,72%. Esses valores mostram a superioridade de Ep1F/Ep1R na detecção quando comparado ao TCZ1/TCZ2. Entretanto, por se tratar de uma amostra de indivíduos que possuem contato com os pacientes crônicos, o alto índice de positividade nos resultados de Ep1F/Ep1R poderia ser explicado por uma possível integração do DNA do parasito no hospedeiro. Estudos sobre a integração do kDNA de *T. cruzi* em humanos e em animais, demonstram que esse evento de transferência ocorre frequentemente, seja por transferência vertical ou horizontal, no paciente chagásico e em sua progênie. Esses dados evidenciam a necessidade de investigação quanto à ocorrência desse fenômeno no grupo de indivíduos estudados (SIMONSON *et al.*, 2005; CHOI e KIM, 2007; NITZ *et al.*, 2004; GOMES, 2006; HECHT, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2011; SOUSA, 2012).

Quanto aos demais métodos apresentados (Tabela 19) o que demonstrou maior positividade foi o PCRc (63,63%) seguido do ELISA (18,18%). Já o RIFI apresentou valor de positividade baixo (9,09%) quando comparado aos valores dos demais métodos (ANEXO 2).

Tabela 19: Positividade (%) de 11 amostras de sangue de familiares de pacientes crônicos avaliadas por Real Time PCR com os iniciadores TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R, ELISA, RIFI e PCRc – TCZ1/TCZ2.

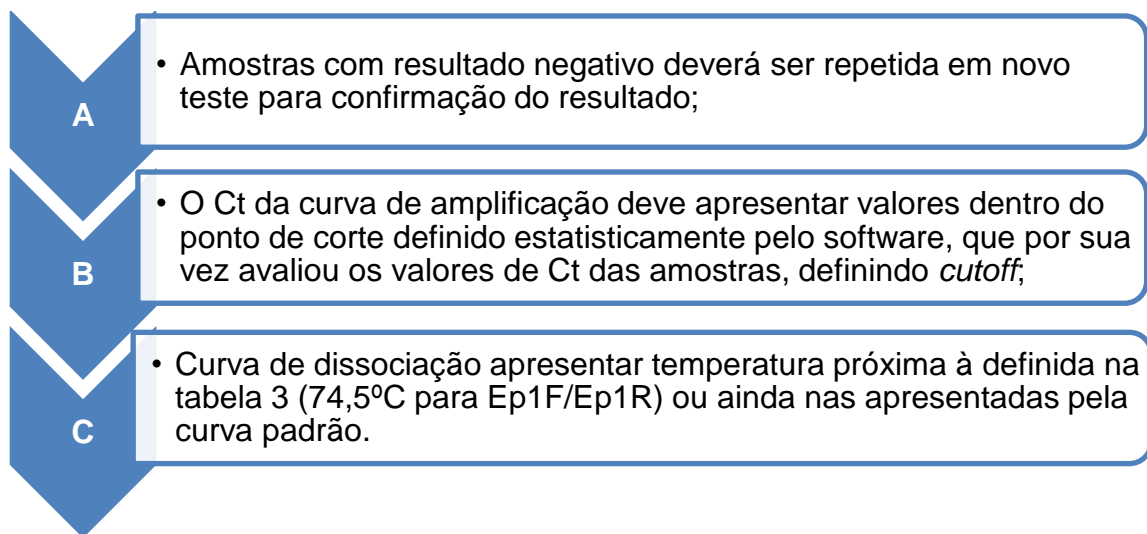
	<i>Real Time</i>		ELISA	RIFI	PCRc TCZ1/TCZ2
	TCZ1/TCZ2	Ep1F/Ep1R			
Positividade	27,27%	72,72%	18,18%	9,09%	63.63%
Total (N)	11	11	11	11	11

Legenda: Positividade – Número de pacientes positivos; N – Número total de pacientes da amostragem; PCRc - PCR convencional;

5.2.3. *Real Time PCR* TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R na Determinação de *T. cruzi* em Pacientes Crônicos e Contatos

Em função dos resultados obtidos na análise estatística de *Real Time PCR*, foi proposto um algoritmo (Tabela 20) para que uma amostra possa ser enquadrada como positiva.

Tabela 20: Algoritmo para o estabelecimento de uma amostra como positiva.



O Ministério da Saúde preconiza que o diagnóstico da DC na fase crônica seja realizado essencialmente por meio das provas sorológicas (RIFI e ELISA). O diagnóstico deve ainda, além de ser utilizado um teste de elevada sensibilidade (ELISA com antígeno total ou RIFI), deve ser utilizado ainda outro de alta especificidade concomitantemente, deixando evidente as limitações das provas sorológicas (BRASIL, 2005).

Dessa forma, o diagnóstico dos pacientes definidos na amostragem foi realizado, nesse trabalho, empregando a curva padrão padronizada conforme descrito anteriormente e mediante a aplicação do algoritmo. O *Real Time PCR* foi realizado nas amostras de pacientes e contatos utilizando os pares de primer TCZ1/TCZ2 e Ep1F/Ep1R.

Para as reações de *Real Time PCR* onde foram utilizados os primers TCZ1/TCZ2 verificou-se 46 pacientes positivos para DC entre todos os indivíduos analisados, sendo que desses indivíduos positivos, três eram indivíduos contatos.

Para as reações que foram realizadas com os iniciadores Ep1F/Ep1R foram verificados 56 pacientes positivos, sendo que oito eram do grupo dos contatos e os demais pacientes crônicos.

Ao final dos testes e analisando os resultados obtidos, é possível afirmar que a utilização do *Real Time* PCR é viável, principalmente em casos confirmatórios e em pacientes crônicos.

5.3. REAL TIME PCR PARA MONITORAMENTO DE *T. cruzi* EM AMOSTRAS DE AÇAÍ

As amostras de açaí autoclavadas e contaminadas com a cepa CUR98, submetidas à amplificação com primers Bp1F/Bp1R e Bp2F/Bp2R, não apresentaram curvas de amplificação de DNA. Nas amostras de açaí *in natura* o primer Bp1F/Bp1R também não apresentou amplificação, isso se deve possivelmente aos elevados valores de Ct encontrados na etapa de padronização desse par de primer, sugerindo que o mesmo poderia detectar outras espécies do parasito que não a utilizada neste estudo. Já o par de primers Bp2F/Bp2R amplificou uma concentração mínima de 0,000019 p/mL, o que sugere um bom limite de detecção. Os demais pares de primers amplificaram todas as concentrações de DNA estudadas (Tabela 21).

Tabela 21: Resultados dos limites de detecção da cepa CUR98 para a técnica de *Real Time PCR* em amostras de açaí.

	CONCENTRAÇÕES DE PARASITOS - CEPA CUR98			PRIMERS
	19000 p/mL	0,19 p/mL	0,000019 p/mL	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	TCZ
IN NATURA	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	
AUTOCLAVADO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	Bp1
IN NATURA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	
AUTOCLAVADO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	Bp2
IN NATURA	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Ep1
IN NATURA	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Ep2
IN NATURA	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Ep3
IN NATURA	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Ep4
IN NATURA	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	

Legenda: p/mL – parasitos por mililitro

Para as amostras de açaí autoclavada e contaminadas com *T. cruzi* artificialmente (cepa HC27), todos os primers apresentaram amplificação em pelo menos uma das concentrações. É importante destacar que os primers TCZ1/TCZ2 e Ep3F/Ep3R detectaram a presença do parasito em concentração de $7,5 \cdot 10^{-5}$ p/mL, demonstrando uma alta sensibilidade da técnica para o monitoramento de *T. cruzi*. Quanto ao limite máximo de detecção para ambos iniciadores, a maior concentração verificada foi, $7,5 \cdot 10^4$ p/mL, todos os primers conseguiram apresentar amplificação (Tabela 22).

Nas amostras *in natura* do açaí apenas o par de primer Bp1F/Bp1R não detectou nenhuma das concentrações. Quanto aos demais pares de primers nenhum apresentou amplificação na concentração máxima de $7,5 \cdot 10^4$ p/mL. Na concentração mínima de $7,5 \cdot 10^{-5}$ p/mL, apenas o par de primer Ep2F/Ep2R apresentou amplificação da concentração que indicava o limite mínimo de detecção da técnica aplicada (Tabela 22). Pela amplificação das concentrações intermediárias de DNA de *T. cruzi* em amostras de açaí *in natura* e autoclavado, deve-se,

possivelmente, a interferência dos extremos de concentração das amostras contaminadas na atividade da enzima Taq Polimerase. Os resultados obtidos indicam que, por análise dos limites de detecção da técnica com a cepa CUR 98 e HC27, a primeira apresenta uma melhor detecção.

Tabela 22: Resultados dos limites de detecção da cepa HC27 para a técnica de *Real Time* PCR em amostras de açaí

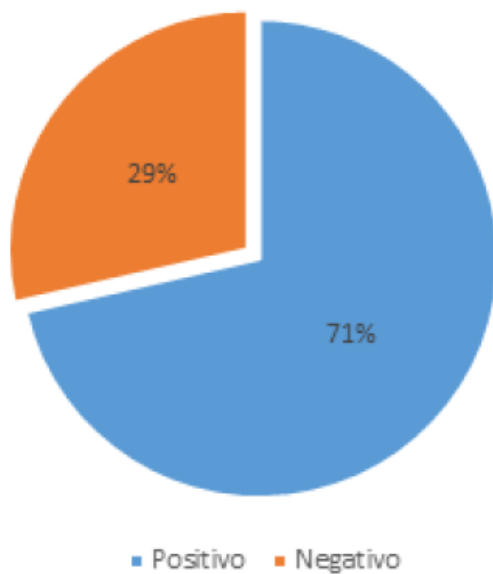
	CONCENTRAÇÕES DE PARASITOS – CEPHA HC27			PRIMERS
	75000 p/mL	0,75 p/mL	0,000075 p/mL	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	TCZ
IN NATURA	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	Bp1
IN NATURA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	Bp2
IN NATURA	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	Ep1
IN NATURA	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	Ep2
IN NATURA	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Ep3
IN NATURA	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	
AUTOCLAVADO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	Ep4
IN NATURA	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	

Legenda: p/mL – parasitos por mililitro

Em amostras contaminadas com a cepa HC27, o açaí autoclavado apresentou maior amplitude de resultados positivos quando comparado ao açaí *in natura* conforme pode ser verificado no Gráfico 4 abaixo. ROGEZ, 2000 verificou que as propriedades físico-químicas da polpa do açaí são modificadas com o aumento da temperatura (polpa autoclavada), ocasionando a perda de pelo menos metade do conteúdo de polifenóis e antocianinas, assim como outros nutrientes do conteúdo da polpa, aumentando também a atividade antioxidante da mesma. Portanto, a amostra autoclavada do presente estudo apresentou melhor detecção, por modificação nas propriedades físico químicas da polpa, possibilitando a liberação do DNA por fluidificação da amostra, tendo em vista que a quantidade de

lipídeos presente no fruto do açaí varia entre 42,61% a 52,64%. Além disso, o tratamento prévio da amostra de açaí com alta temperatura e pressão (autoclave), promoveu a fragmentação, destruição ou até a eliminação por completo do DNA do açaí, fazendo com que o mesmo não interferisse na reação, que passou a ter como alvo apenas o DNA de *T. cruzi* (CONTRI, 2006, MENEZES, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2008; CASTRO, 2012).

AÇAÍ AUTOCLAVADO - HC27



AÇAÍ IN NATURA - HC27

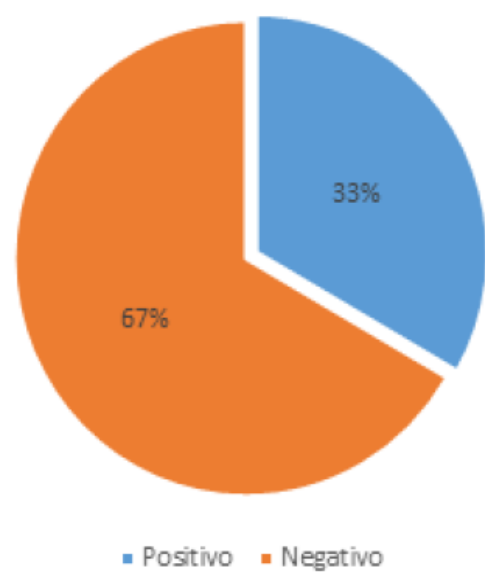


Gráfico 4: Resultados positivos na detecção de *T. cruzi* em amostras de açaí autoclavado e *in natura* contaminadas com cepa HC27.

Em amostras de açaí contaminadas com a cepa CUR98, o açaí autoclavado apresentou uma amplitude de resultados positivos em torno de 71%, já o açaí *in natura* conforme pode ser verificado no Gráfico 5, apresentou positividade de 76%. Esses valores são discordantes com os resultados obtidos com a contaminação artificial do açaí com a cepa HC27, de forma que, fica evidente melhor detecção da cepa CUR98 em ambas as situações propostas, uma vez que a diferença entre as amostras autoclavadas e *in natura* foi de apenas uma amostra positiva para o açaí *in natura*.

De forma geral, considerando que todas as amostras submetidas a metodologia proposta eram sabidamente positivas, quanto mais resultados positivos a técnica apresentar, independente do tratamento da amostra de açaí, melhor será o

desempenho da detecção. Desse modo, quanto a positividade total, a cepa CUR 98 foi detectada em 73,8% das amostras, com diferentes concentrações, já a cepa HC 27 foi detectada em 52,4% das amostras, mostrando a superioridade da técnica empregada em detectar *T. cruzi* proveniente do vetor *P. megistus* com genótipo I e II (CUR 98).

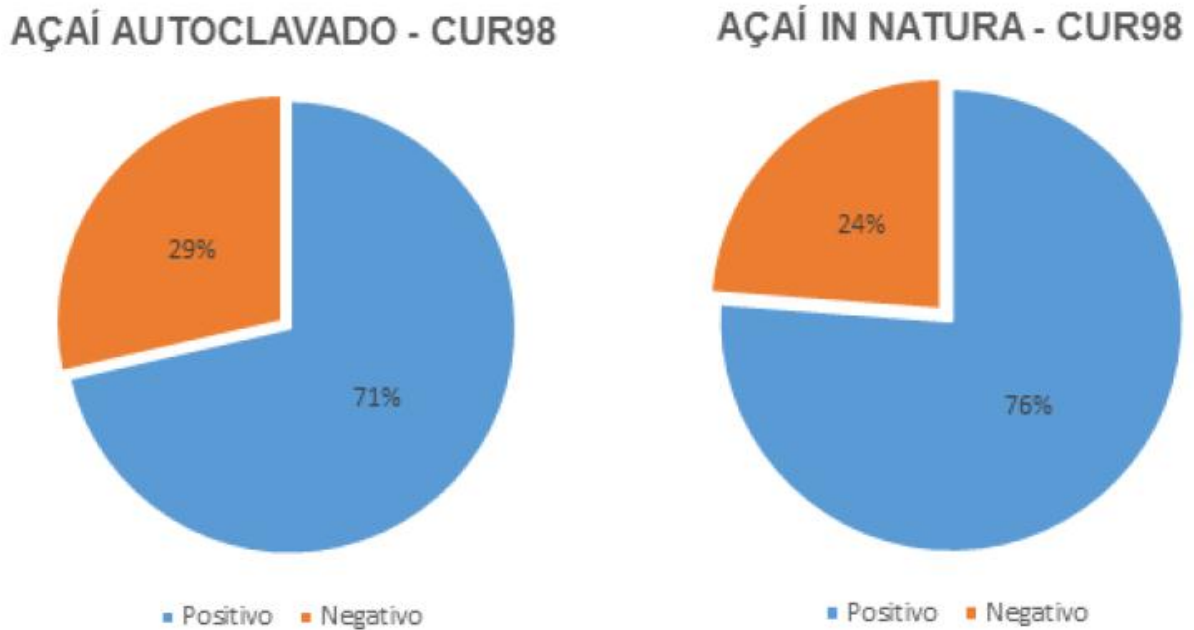


Gráfico 5: Resultados positivos na detecção de *T. cruzi* em amostras de açaí autoclavado e *in natura* contaminados com a cepa CUR98

O açaí contaminado pelo *T. cruzi* é considerado a principal hipótese da ocorrência de casos de DC no Norte do país (PASSOS *et al.*, 2012). Os resultados obtidos no presente trabalho são animadores no âmbito do monitoramento de *T. cruzi*, em açaí, pois experimentos comprovaram que polpa contaminada com o parasito, quando submetidos a refrigeração ou até mesmo congelamento, ainda é capaz de contaminar camundongos e causaram DC nos animais.

6. CONCLUSÃO

- Os primers delineados e caracterizados nesse estudo representam boas perspectivas para o estudo e determinação de *T. cruzi*. Os melhores resultados foram obtidos para o *primer* Ep1F/Ep1R. O primer Bp1F/Bp1R, também não amplificou as amostras de indivíduos controles negativos.
- A técnica de *Real Time* PCR com os iniciadores Ep1F/Ep1R e TCZ1/TCZ2 foi capaz de detectar níveis de parasitemia significativamente diferentes, com sensibilidade analítica de até 0,00001 ng/ μ L, como limite mínimo, o equivalente a 0,044 moléculas de parasito, para TCZ1/TCZ2 e de 0,0001 ng/ μ L como limite mínimo para Ep1F/Ep1R, o equivalente a 0,44 moléculas do parasito;
- O par de iniciadores Bp1F/Bp1R apresentou melhor especificidade analítica para *T. cruzi*, não amplificando DNA de *Leishmania* sp. e *T. rangeli* coachi;
- Os valores de temperatura de anelamento calculados pelo software *OligoCalc* foram condizentes com os encontrados na prática, sendo portanto um parâmetro adicional para a verificação da formação de produtos inespecíficos;
- A técnica de *Real Time* PCR para detecção de *T. cruzi* usando o iniciador Ep1F/Ep1R em amostras de 66 pacientes, apresentou 76,7% de especificidade e 71,7% de sensibilidade pela análise da curva ROC;
- Os dados encontrados para TCZ1/TCZ2 em 66 amostras de pacientes, pela técnica de *Real Time* PCR, demonstraram especificidade 69,8% e sensibilidade 79,2% pela análise da curva ROC;
- No aspecto positividade de pacientes o par de iniciadores Ep1F/Ep1R demonstrou superioridade (72,72%) ao valor encontrado para TCZ1/TCZ2 (65,15%) e a PCR convencional (66,66%). Esse primer também foi superior nesse aspecto em indivíduos contatos;
- A *Real Time* PCR em amostras de açai contaminado com a cepa CUR 98, quando autoclavada não apresentou amplificação do DNA do parasito com dois primers

(Bp1F/Bp1R e Bp2F/Bp2R). Quando *in natura*, a amplificação não aconteceu apenas para Bp1F/Bp1R.

- Com o conjunto dos sete primers analisados para o monitoramento de *T. cruzi* em açai, para a cepa CUR 98 não foi verificada diferença significativa entre o açai autoclavado e o *in natura*. No entanto, mostrou superioridade na detecção da cepa HC27 quando o açai foi autoclavado.
- Contaminação experimental de açai com a cepa CUR 98, permitiu reprodutibilidade em 73,8% das amostras e para a cepa HC27 52,4%.

7. PERSPECTIVAS

- É preciso inserir o *Real Time* PCR como método confirmatório para o diagnóstico de *T. cruzi*, com o objetivo de minimizar ou eliminar os resultados duvidosos;
- Aumentar os valores de especificidade e sensibilidade em amostras de pacientes com a utilização de sondas para esses primers, controle interno, temperaturas de ciclagem e ainda aumentar amostragem de pacientes e, sobretudo, de contatos;
- A inserção de novos iniciadores, como os descritos e caracterizados neste estudo, contribuem com a comunidade científica para avançar nas pesquisas sobre *Trypanosoma cruzi*, com novas aplicações a esses primers;
- Realizar a normalização e implantação do método molecular *Real Time* PCR com os primers descritos nesse estudo para o monitoramento de açaí contaminado;
- Os resultados obtidos no presente trabalho são animadores para a realização de novos estudos como por exemplo avaliar primers para a realização de transcrição reversa antes do *Real Time* PCR.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Informes Técnicos - Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. Informe Técnico - nº 35 de 19 de junho de 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35_190608.htm. Último acesso em: 21 de Agosto de 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual técnico de hemovigilância. Brasília, DF; 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 151, de 21 de agosto de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre níveis de complexidade dos serviços de hemoterapia. Diário Oficial da União, Brasília, 22 ago. 2001. Seção 1. Disponível em: <http://pegasus.fmrp.usp.br/projeto/legislacao/RDC%20151%20de%2021%2008%2001.pdf>. Último acesso em 23 de setembro de 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004. Determina o regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea [resolução na internet]. Diário Oficial da União, Brasília, 24 jun. 2004. Seção 1. Disponível em: http://www.sbpc.org.br/upload/noticias_gerais/320100416113458.pdf. Último acesso em: 23 de setembro de 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Relatório de Produção da Hemorrede em 2002: perfil sorológico dos doadores. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Último acesso em 11 de abril de 2014.

AJIOKA, J., SWINDLE. The calmodulin-ubiquitin associated genes of *Trypanosoma cruzi*: their identification and transcription. *Mol. Bioch. Parasit.* v.57, p.127- 36, 1993.

ALMEIDA, M. A. C. DE, BARBOSA, H. S. Megalocolon chagásico congênito. Relato de um caso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.19, p.167-169, 1986.

ALMEIDA, P. S. R.; SADDI, V. A. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v.29(4), p.382-6, 2007.

ARAÚJO, S. M. *et al.* Doença de Chagas em Crianças no Estado do Paraná – Brasil. *Rev. Bras. de Anál. Clín.* v.36(3), p.151-153, 2004.

ARGOLO, A. M., FELIX, M., PACHECO, R., *et al.* Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. Imperial Novo Milênio, PIDC, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. v.1, 64p. Rio de Janeiro, 2008.

BECKMANN, J. S., WEBER, J. L. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics.* v. 12, p. 1–5, 1992.

BECKER, S., BOGER, P., OEHLMANN, R., ERNST, A. PCR bias in ecological analysis: A case study for quantitative *Taq* nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* v.66, p.4945–4953, 2000.

BECKER, S., FRANCO, J. R., SIMARRO, P. P. *et al.* Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v.50, p.193 – 199, 2004.

BEM ABDA, I., DEMONBRISON, F., BOUSSLIMI, N., *et al.* Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous Leishmania species in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. v.105, p.17 e 22, 2011.

BERN, C., KJOS, S., YABSLEY, M. J., MONTGOMERY, S. P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*. v.24, n.4, p.655-81, 2011.

BITTENCOURT, A. L. Actual aspects and epidemiological significance of congenital transmission of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v.79 Suppl:1, p.33-7, 1984.

BITTENCOURT, A. L. Transmissão congênita da doença de Chagas. In: CANÇADO, JR. *Doença de Chagas*, Belo Horizonte, p.100-129, 1968.

BITTENCOURT, A. L., VIEIRA, G. O., TAVARES, H. C., MOTA, E., *et al.*, Esophageal involvement in congenital Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. v.33, p.30-33, 1984.

BLEJER, J. L., SAGUIER, M. C., SALAMONE, H. J. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Buenos Aires, Argentina. *Int. J. Infect. Dis.* v.5(2), p.89-93, 2001.

BORGES-PEREIRA, J., JUNQUEIRA, A. C. V., SANTOS, L. C., *et al.* Xenodiagnóstico na doença de Chagas crônica: sensibilidade de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.29, p.341-7, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de doença de Chagas Aguda por Alimentos. 2008a. Informe Técnico nº 35. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35_190608.pdf >. Último acesso em: 23 de setembro de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Vigilância Sanitária amplia ações no combate a doença de Chagas. 2008b. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/250608_1.htm >. Último acesso em: 23 de setembro de 2014.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: 7 ed. p.816, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa de Qualidade do Sangue - auto-suficiência em sangue, componentes, derivados sanguíneos e correlatos. Programa Avança Brasil/Plano Plurianual (PPA). Brasília, DF; 1998

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN). Doença de Chagas Aguda: manual prático de subsídio à notificação obrigatória no SINAN. 20p, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.v.38 Suppl 3:S30, p.1 – 29, 2005.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa Amazônia Oriental. Sistema de Produção do Açaí. Vol. 4 - 2ª Edição Dez., 2006.

BRENIÈRE, S. F. *et al.* Direct identification of *Typanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 46, p.335-341, 1992.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M. E. & Rassi, A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. p.13-19. São Paulo, 1992.

BRISSE, S., BARNABE, C., TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int. J. Parasitol. v.30: p.35–44, 2000.

BRITTO, C. *et al.* A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR) based diagnosis of chronic Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Vol. 88, p.171-172, 1993.

BRENER, Z., ALQUEZAR, A. S., LUQUETI, A. Normas de segurança para infecções acidentais com *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Rev. Patol. Trop. v.26, p.129-130, 1997.

BRENER, Z. Laboratory acquired Chagas' disease: endemic among parasitologists? In: MOREL, C. M., editor. Genes and antigens of parasites: a laboratory manual. 2^a ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. p.3-9, 1954.

BRENNER, Z., ANDRADE, Z., BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.

BRUCE, A., BRAY, D., JOHNSON, A., *et al.* Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999.

BUA, J., VOLTA, B. J., VELAZQUEZ, E. B., RUIZ, A. M., *et al.* Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v.106, p.623– 628, 2012.

CALDAS, S., CALDAS, I. S., DINIZ, L. F. *et al.* Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Acta Tropica. v.123, p.170– 177, 2012.

CAMANDAROBA, E. L., PINHEIRO LIMA, C. M., ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric

experimental infection. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. v.44(2), p.97-103, 2002.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Revista Brasileira de Patologia Clínica. v.10, p.57-71, p.87-107, p.143-171, 1974.

CAMARGO, M. E., BATISTA, S. M., HOSHINO-SHIMIZU, S. Avaliação de reagente liofilizado de hemaglutinação para diagnóstico da tripanossomíase americana: estudo em 1.123 soros de doadores de sangue. Rev. Inst. de Med. Trop. de São Paulo. v.17, p.350-354, 1975.

CAMARGO, N. J. Erradicação do *Triatoma infestans* nos municípios do Paraná, Brasil. I Encontro Paranaense de Parasitologia, Curitiba, 2007.

CARO-RIANO, H., JARAMILLO, N., DUJARDIN, J. P. Growth changes in *Rhodnius pallescens* under simulated domestic and sylvatic conditions. *Infection, Genetics and Evolution*, v.9; p.162-8, 2009.

CARVALHO, C.V., RICCI, G., AFFONSO, R. Guias de Práticas em Biologia Molecular. Yendis Editora, São Caetano do Sul, SP.; 283p., 2010.

CASTRO, N., ALVES, M. T., MACEDO, V. O. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.16, p.98-113, 1983.

CASTRO, R. W. Caracterização de açaí obtido de frutos de *Euterpe edulis martius* tratados termicamente. Trabalho de Conclusão de Curso. Florianópolis, 2012.

CASTRO, A. M., VINAUD, M. C., TEIXEIRA, A. R. Chagas disease: a global health problem. Emerging chagas disease. TEIXEIRA, A. R. C., A.M.; VINAUD, M.C. New York, NY: Bentham Science Publishing: 6 P. 2009.

CHAGAS, C. Nova espécie mórbida do homem, produzida por um tripanossoma (*Trypanosoma cruzi*): nota prévia. Brazil Médico, v.23, p.161, 1909.

CHIARI, E., DIAS, J. C. P., LANA, M., CHIARI, C. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.22, p.19-23, 1989.

CHIEFFI, P. P., AMATO NETO, V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. CLB Balieiro Editores. São Paulo, 2000.

CHOI, I. G., KIM, S. H. Global extent of horizontal gene transfer. PNAS. v.104(11), p.4489-94, 2007.

CÔBO, E. C. Pesquisa do *Trypanosoma cruzi* e análise do infiltrado inflamatório no esôfago e cólon de chagásicos crônicos com e sem mega. [Dissertação]. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba, 2009.

COLEMAN, W. B., TSONGALIS, G. J. Molecular diagnosis: For the clinical laboratorian, 2^aed, 2006.

CONTRI, D. G. Detecção de resíduos de DNA em alimentos: Avaliação da qualidade, quantidade e da capacidade de amplificação por PCR de DNA extraído de matérias primas e produtos acabados para fins de análise de transgenia. [Dissertação]. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.102 (Suppl. I), p.113-122, 2007.

COUTINHO, E. S. F., CUNHA, G. M. Conceitos básicos de epidemiologia e estatística para a leitura de ensaios clínicos controlados. *Rev. Bras. Psiquiatr*. v.27(2), p.146-51, Rio de Janeiro, 2005.

CRUZ, I., CAÑAVATE, C., RUBIO, J. M., MORALES, M. A., *et al.* A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. v.96: S1/185-S181/189, 2002.

CUMMINGS, K. L., TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v.129, p.53–59, 2003.

DA SILVA, N. N., CLAUSELL, D. T., NÓBILIS, H., DE MELLO, A. L., *et al.* Epidemic outbreak of Chagas disease probably due to oral contamination. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. v.10, p.265–76, 1968.

DEAN, M., BALLARD, J. W. O. Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. v.98, p.279–283, 2001.

DE FREITAS, V. L., DA SILVA, S. C., SARTORI, A. M., BEZERRA, R. C. Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2011.

DIAS, J. C. P. Mecanismos de transmissão. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. A., editores. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.152-179, 1979.

DIAS, J. C. P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v.39, n.4, p.370-375, 2006a.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. Rev. Bras. Hematol. Hemoterapia, Belo Horizonte, v.28, n.2, p.83-84, 2006b.

DIAS, J. C. P. Control of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and non-endemic countries. Transfusion. v.31, p.547-557, 1991.

DIAS, J. P., BASTOS, C., ARAÚJO, E., MASCARENHAS, A. V., *et al.* Surto de doença de Chagas aguda associada à transmissão oral. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v.41(3), p.296-300, 2008.

DIAS, J. C. P., MACÊDO, V. O. Doença de Chagas. *In*: COURA JR, editor. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.557-594, 2005.

DIAS, J. C. P., SILVEIRA, A. C. Enfermedad de Chagas en las Américas: situación actual y perspectivas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.38, p.5-13, 2005.

DIOTAIUTI, L., AZEREDO, B. V., BUSEK, S. C., FERNANDES, A. J. Controle de *Triatoma sordida* em ambiente peridoméstico no Município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. *Revista Pan. de Saúde Pública.* Washington, OPAS, p.21-25, 1998.

DUFFY, T., BISIO, M., ALTCHEH, J., *et al.* Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* v.3:e419, 2009.

DUFFY, T., CURA, C. I., RAMIREZ, J. C., *et al.* Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* v.7, Jan., 2013.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v. 309, p. 409-415, 2005.

FARIA, J. R. A. B.; REIS, D. G.; RABELLO, N. N.; RABELO, N. N. *et al.* Doença de Chagas congênita com manifestações pleomórficas. Relato de caso. *Rev. Bras. Clin. Med.* v.11, p.80-4, São Paulo, 2013.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol. Rev.* v.36(3), p.734-747, 2012.

FAY, M. P. Exact McNemar's Test and Matching Confidence Intervals. Abril, 2014.

Disponível em:

<<http://cran.rproject.org/web/packages/exact2x2/vignettes/exactMcNemar.pdf>>.

Último acesso em: 22 de março de 2014.

FERRAZ, A. S.; FIGUEIREDO, J. F. C. Transmission of Chagas Disease through transplanted kidney: Occurrence of the acute form of the disease in two recipients from the same donor. *Rev. Med. Trop. São Paulo.* São Paulo, v.35, p.461-463, 1993.

FERREIRA, A. W. *et al.* Enzyme-linked immunoabsorbent assay for serological diagnosis of Chagas disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consist of four different peptides. *J. Clin. Microbiol.* v.39, p.4390-4395, 2001.

FERREIRA, I. D., ROSÁRIO, V. E., CRAVO, P. V. *Real-time* quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* v.5, p.1, 2006.

FRANCINO, O., ALTET, L., SANCHEZ-ROBERT, E., *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* v.137, p.214-221, 2006.

FREITAS JLP, AMATO NETO V, SONNTAG R, *et al.* Primeiras ratificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. Ver. Paul. Med. 1952; v.40, p.36-40.

FREITAS, J. M., LAGES-SILVA, E., CREMA, E., PENA, S. D., MACEDO, A. M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. Int. J. Parasitol. v.35 (4) p.411-417, 2005.

FREILIJ, H., MULLER, L., CAPPA, S. M. G. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. Journ. of Clin. Microb. v.18, p.327-330, 1983.

FREITAS, V. L. T. Avaliação dos níveis de parasitemia por PCR em tempo real em pacientes com doença de Chagas crônica e pacientes com coinfeção HIV – *Trypanosoma cruzi*, com e sem reativação da doença de Chagas. [Tese]. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

FURUCHO, C. R. Diagnóstico da doença de Chagas em bancos de sangue: linfoproliferação, detecção de anticorpos e estudo epidemiológico em indivíduos com provas sorológicas inconclusivas. [Dissertação]. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

GABERT, J. *et al.* Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia: A Europe Against Cancer Program. *Leukemia*, v.17, p.2318-57, 2003.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D.S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202. Auckland: Magnolia, p.1-36, 2003.

GASCON, J., BERN, C., PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* v.115, p.22-27, 2010.

GILBER, S. R. Reação em cadeia da polimerase em comparação com o teste de imunofluorescência indireta (IFI), e ELISA (Enzimaimunoensaio) no diagnóstico para Doença de Chagas, 2008.

GILBER, S. R., ALBAN, S. M., GOBOR, L. *et al.* Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.* v.46(3), p.310 - 315, May-Jun, 2013.

GOBOR, L. C. Caracterização de grupos para estudo da integração do kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma humano e identificação das avaliações das linhagens do parasito em pacientes do Estado do Paraná. [Dissertação] Universidade Positivo, 91p. Curitiba, 2012.

GODSEL, L. M. *et al.* Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Clin. Microb.* v.33, n.8, p.971 - 974, Aug. 1995.

GOEDBLOED, E. M. Hemoculture compared with xenodiagnoses for the detection of *T. cruzi* infection in man and in animals. In: *New Approaches in American Trypanosomiasis Research*. Pan-Am Health Org. Sc. Publ. v.318, p.245-252, 1976.

GOMES, C. C. Lesões típicas da doença de Chagas em aves com genoma alterado por interações de sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi*. Tese. Universidade de Brasília, 2006.

GONTIJO, E. D., ANDRADE, G. M. Q., SANTOS, S. E., GALVÃ, L. M. C., *et al.* Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. *Epidemiol. Serv. Saúde*. Jul - Set; v.18(3), p.243-54, 2009.

GUERREIRO, C., MACHADO, A. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Chagas como elemento diagnóstico: Nota prévia. *Brazil-Medico* 27:225-226.

GUHL, F., RAMÍREZ J. D. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop.* v.119, p.1–4, 2011.

HECHT, M. M. Transferência horizontal de sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de chagásicos e herança vertical das mutações. [Tese]. Universidade de Brasília, 2008.

HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J., WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* v.6, p.986–994, 1996.

HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P. S., GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* v.10(4), p.413-7, 1992.

HOARE, C. A. The Trypanosomes of mammals. A zoological monograph, Blackwell Scientific Publication, Oxford-Edinburgh, 749p, 1972.

HOCHHAUS, A. *et al.* Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. v.14(6), p.998-1005, 2000.

HOCHKIRCH, A., DEPPERMAN, J., GRONING, J. Phenotypic plasticity in insects: the effects of substrate color on the coloration of two ground-hoppers insects. *Evolution & Development*, v.10; p.350-9, 2008.

HOWARD, J. E. Clinical aspects of congenital Chagas disease. In: New Approaches in American Trypanosomiasis Research. PAHO. Sc. Publ. v.38, p.212-215, 1976.

II CONGRESSO NACIONAL DE MEDICINA TROPICAL. 2013, Lisboa. Disponível em: <<http://congressomedtrop.ihmt.unl.pt/apresentacoes.html>>. Último acesso em: 06 de setembro de 2014.

INTERNATIONAL SYMPOSIUM TO COMMEMORATE THE 90TH ANNIVERSARY OF THE DISCOVERY OF CHAGAS DISEASE, 1999, Rio de Janeiro. Recommendations from a satellite meeting. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999. v.94: p.429–432.

IZQUIERDO, L., MARQUES, A. F., GÁLLEGO, M., *et al.* Evaluation of a chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in a nonendemic setting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro: p.1-4, 2013

JARAMILLO, N., CASTILLO, D., WOLFF, M. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, p.667-73, 2002.

JUNQUEIRA, A. C., CHIARI, E., WINCKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.90, p.129–132, 1996.

JONHSON, V. J., YUCESYO, Y. B., LUSTER, M. I. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. *Cytokine*. v.27(6), p.135-41, 2004.

KABIRI, M., FRANCO JR, SIMARRO, P. P. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Trop Med Int Health*. v.4, p.658–661, 1999.

KAEDA, J. *et al.* Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol*, v. 107, p. 64-75, 2002.

KANMOGNE, G. D., ASONGANYI, T., GIBSON, W. C. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense*, in serologically positive but aparasitaemic sleeping-sickness suspects in Cameroon, by PCR. *Ann Trop Med Parasitol*. v.90, p.475–483, 1996.

KIRCHHOFF, L. V., VOTAVA JR, OCHS, D. E., MOSER, D. R. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J. Clin. Microbiol.* v.34, p.1171-5, 1996.

KOPP, R. L. Variabilidade genética de *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 (*Hemiptera: Reduviidae: Triatominae*) e sua implicação na epidemiologia de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 em dois focos no Estado do Paraná. [Tese de Doutorado] Universidade Federal do Paraná. p. 204, Curitiba, 2002.

KRAUTZ, G. M.; GALVÃO, L. M.; CANÇADO, J. R. Use of a 24-kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas disease. *J. Clin. Microb.* v.33, n.8, p.2086-2090, Aug. 1995.

KRIEGER, M.A., ALMEIDA, E., OELEMMAN, W., *et al.* Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.46, p.427-434, 1992.

KUBISTA, M., ANDRADE, J. M., BENGTSSON, M., *et al.* The real time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* v.27(2-3), p.95-125, 2006.

KYAMBADDE, J. W., ENYARU, J. C. K., MATOVU, E., *et al.* Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction. *Bull World Health Organ.* v.78, p.119 –124, 2000.

LAGES-SILVA, E.; RAMÍREZ, L.E.; PEDROSA, A.L.; CREMA, E.; GALVÃO, L.M.C; PENA, S.D.J.; MACEDO; A.M.; CHIARI, E. Variability of Kinetoplast DNA Gene Signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* v.44 (6): p.2167–2171, 2006.

LANA, M., TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. Parasitologia humana. 10ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. *et al.* Parasitologia Humana. 11ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

LEHANE, M. J., SCHOFIELD, C. J. Field experiments on dispersive flight by *Triatoma infestans*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.75, p.399-400, 1981.

LEHANE, M. J., SCHOFIELD, C. J. Flight initiation in *Triatoma infestans*. *Bulletin of Entomological Research*, v.72, p.497-510, 1982.

LEHANE, M. J., MCEWAN, P. K., WHITAKER, C. J., SCHOFIELD, C. J. The role of temperature and nutritional dependence in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*. v.52, p.27-38, 1992.

LEVINE ND, CRLISS JO, COX FEG, DEROUX G, GRAIN J, HONINGBERG BM, *et al.* A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* v.27, p.37-58, 1980.

LIFE TECHNOLOGIES, *Real-time PCR handbook*, 2012. Documento interno enviado por email.

LINDOSO, A. A. B. P. Reação da polimerase em cadeia na doença de Chagas crônica: Emprego de dois pares de iniciadores TCZ1/TCZ2 e S35/S36 em isolados de *Trypanosoma cruzi* de sangue de pacientes e em outros tripanosomatídeos, [Tese de mestrado] São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 1998.

LUQUETTI, A. O., RASSI, A. Diagnostico Laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z., ANDRADE, A. A., BARRAL- NETTO, M. (Eds.), *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.344–378, 2000.

LUZ, Z. M. P., GARCIA, M. C., CANÇADO JR, KRETTLI, A. U. High possibility of hemocultures in untreated patients in different age groups. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. p.88:244, 1993.

MACEDO, A. M., MACHADO, C. R., OLIVEIRA, R. P., PENA, S. D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.99 (1), p.1-12, 2004.

MACEDO, A. M., PENA, S. D. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitol Today. v.14: p.119–124, 1998.

MACKAY, I. M. *Real-time* PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. Caister Academic Press. Norwich, United Kingdom.

MANNA, L., REALE, S., VITALE, F., *et al.* *Real-time* PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J.* v.177, p.279-282, 2008.

MARGOTTO, P. R. CURVA ROC: Como fazer e interpretar no SPSS. Brasília, 11 de junho de 2010. Disponível em:

<http://www.paulomargotto.com.br/documentos/Curva_ROC_SPSS.pdf>. Último acesso em: 14 de agosto de 2014.

MARIM, R. G. Definição de parâmetros epidemiológicos e parasitológicos da doença de Chagas em Santander – Colômbia, e características de seu agente etiológico. 154p. Dissertação [Mestrado] - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

MARTINS-MELO, F. R., RAMOS JR., A. N., ALENCAR, C. H., HEUKELBACH, J. Multiple causes of death related to Chagas disease in Brazil, 1999 to 2007. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.45, p.591–596, 2012.

MARTINS-MELO, F. R., HEUKELBACH, J. Epidemiology and spatial distribution of mortality related to Chagas disease in Brazil, 1999 to 2007. *Cad. Saúde Col.* v.21, p.105–106, 2013.

MARTÍNEZ V, QUILEZ J, SANCHEZ A, *et al.* 2011. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasite Vectors* 4: 2-5.

MARTINEZ, E. Z., LOUZADA-NETO, F., PEREIRA, B. B. A curva Roc para testes diagnósticos. *Cad. Saúde Col.* v.11 (1), p.7-31, 2003.

MARY, C., FARAUT, F., LASCOMBE, L., DUMON, H., *et al.* Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a *real-time* PCR assay with high sensitivity. *J. Clin. Microbiol.* v.42, p.5249 e 55, 2004.

MELO, M. F. A. D. Avaliação da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Trypanosoma cruzi* em soro e em sangue de pacientes com doença de chagas crônica. Recife, 135f, 2010.

MENEZES, E. M. S. Efeito da alta pressão hidrostática em polpa de açaí pré-congelada (*Euterpe oleracea*, Mart.). [Dissertação], Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 83p., 2005.

METZ, C. E. Basic principles of ROC analysis. Semin. Nucl. Med. v.8, p.283–289, 1978.

MOREIRA, C. J. C., PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Attempts to improve xenodiagnosis: comparative test of sensitivity using *Rhodnius neglectus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma vitticeps*, *Triatoma infestans* in endemic areas of Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.92, Supl 1, p.91-6, 1997.

MOREIRA, O. C., RAMÍREZ, J. D., VELÁZQUEZ, E., *et al.* Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. Acta Trop. v.125, p. 23–31, 2013.

MORTARINO, M., FRANCESCHI, A., MANCIANTI, F., *et al.* Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. Parasitologia. v.46 (1-2), p.163-7, 2004.

MULLIS, K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. p.56-65, Abr., 1990.

NASCIMENTO, S., SUAREZ, E. R., PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. Moreira JR Editora, São Paulo, 2013. Disponível em: <www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=4499&fase=imprime 1/17>. Último acesso em: 10 de Junho de 2014.

NASCIMENTO, R. J. S., COURI, S., ANTONIASSI, R., FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal - SP, v.30, n.2, p.498-502, Jun., 2008.

NAZÁRIO, C. A. F. S. Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de *Trypanosoma* spp. em glossinas (Diptera: Glossinidae) da República da Guiné-Bissau. Universidade Nova de Lisboa, [Dissertação]. Lisboa, 2012.

NEVES, D. P. *et al.* Parasitologia humana. 11ªed. São Paulo: Atheneu, 494p, 2007.

NITZ, N., GOMES, C., ROSA, A. C., SOUZA – AULT, M. R., *et al.* Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human chagas disease. Cell. v.118(2), p.174-186, 2004.

NÓBREGA, A. A., GARCIA, M. H., TATTO, E., OBARA, M. T., *et al.* Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. Emerg. Infect. Disea. v.15(4), p.653-655, 2009.

OPAS. Curso de capacitação dos microscopistas de malária e dos laboratoristas da rede pública na detecção do *Trypanosoma cruzi*. Laboratório de Doenças Parasitárias Medicina Tropical IOC-FIOCRUZ. Módulos I, II e III. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em:

http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=1193&Itemid=423>. Último acesso em: 15 de março de 2014.

OPAS. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. – Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, Serie de Manuais Técnicos, 12, 92p, 2009.

OSTERMAYER, A. L., PASSOS, A. D. C., SILVEIRA, A. C., FERRERIA, A. W., *et al.* O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008). Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.44 Suppl 2, p.108-21, 2011.

PAIVA-CAVALCANTI, M., BRITO, M. E. F., SOUZA, W. V., *et al.* The development of a *real-time* PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. Vet J. v.182(2), p.356-8, 2009.

PAIVA-CAVALCANTI, M., REGIS-DA-SILVA, C. G., GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. v.16, p.537-542, 2010.

PANJKOVICH, A., MELO, F. Comparison of different melting temperature calculation methods for short DNA sequences. Bioinformatics, v.21, p.711–722, 2005.

PARANHOS-BACALLA, G. S. *et al.* Detection of antibodies in será from Chagas disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. Parasite Immunology, v.16, n.3, p.165-169, 1994.

PASSOS, L. A. C., GUARALDO, A. M. A., BARBOSA, R. L., *et al.* Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v.21(2), p.223-232, abr-jun, 2012.

PEHRSON, P. O., WAHLGREN, M., BENGTSSON, E. Intracranial calcifications probably due to congenital Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.31, p.449-451, 1982.

PENCHENIER, L., SIMO, G., GREBAUT, P. *et al.* Diagnosis of human trypanosomiasis, due to *Trypanosoma brucei gambiense* in central Africa, by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.94, p.392-394, 2000.

PENNISI, M. G., REALE, S., GIUDICE, S. L., *et al.* Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun.* v.29, *Suppl 2*, p.301-303, 2005.

PERALTA, J. M. *et al.* Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J. Clin. Microb.* v.32, n.4, p.971-974, 1994.

PEREIRA, K. S., SCHMIDT, F. L., BARBOSA-LABELLO, R., GUARALDO, A. M. A., FRANCO, R. M. B., DIAS, V. L., *et al.* Transmission of Chagas' disease (American trypanosomiasis) by foods. In: TAYLOR, S. *Advances in food and nutrition research*. California: Elsevier. p.63-85, 2010.

PÉREZ-GUTIÉRREZ, E., AGRELO, R. S., FIGUEROA, R. Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como

doença transmitida por alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.39(5), p.512-514, 2006.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A., MULLER, C. A., MOREIRA, C. J. C. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of host with Chagas disease. The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Rev. Saúde Pública*. v.24, p.165-77, 1990.

PINEDA, J. P., LUQUETTI, A. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.31, p.473-80, 1998.

PINTO, A. Y. N., VALENTE, V. C., VALENTE, S. A. S., FIGUEIRAS, A. C. M. Doença de Chagas congênita por infecção aguda maternal por *Trypanosoma cruzi* transmitida via oral – Relato de caso <http://revista.iec.pa.gov.br>. *Rev. Pan-Amaz. Saúde*. v.2(1), p.89-94, 2011.

PIRON, M., FISA, R., CASAMITJANA, N., *et al.* Development of a Real-Time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*. v.103, p.195–200, 2007.

PIRON, M. *et al.* Soroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion*, v.48, n.9, p.1862-1868, 2008.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B., SHIKANAI-YASUDA, M. A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev. Saúde Púv.* v.37(1), p.107-15, 2003.

PRATA, A. Chagas' heart disease. *Cardiology*. v.52: p. 79-96, 1968.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* v.1(2), p.92-100, 2001.

RADWANSKA, M., CLAES, F., MAGEZ, S., MAGNUS, E. Novel primer sequences for polymerase chain reaction- based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am J Trop Med Hyg.* v.67, p.289–295, 2002.

RAMAKERS, C., RUIJTER, J. M., DEPREZ, R. H., MOORMAN, A. F. M. Assumption free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* v.339, p.62–66, 2003.

RAMOS JR., A. N., MARTINS-MELO, F. R., BARBOSA, J. C., HEUKELBACH, J. The role of operational research and the challenges for integration of care and control of Chagas disease in the Brazilian Unified Health System. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.43 (Suppl. 2), p.12–17, 2010.

RAMPAZZO, R. C. P., CEREDA , M., COCCI , A., *et al.* Demonstration of an On-Chip *Real Time* PCR for the Detection of *Trypanosoma cruzi*. XIII Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing. v.41, p.872-875, 2014.

RASSI, A., PORTO, C. C., REZENDE, J. M. de. Doença de Chagas. In: AMATONETO, V., BALDY, J. L. da S. Doenças Transmissíveis. 3ª ed. São Paulo: Sarvier. p.247-263, 1991.

RÊGO, J. V., DUARTE, A. P., LIARTE, D. B., *et al.* Molecular characterization of Cyclophilin (TcCyP19) in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Exp. Parasit.*, v.148, p.73–80, Jan., 2015.

RENDELL, V. R., GILMAN, R. H., VALENCIA, E., *et al.* *Trypanosoma cruzi*-Infected Pregnant Women without Vector Exposure Have Higher Parasitemia Levels: Implications for congenital transmission risk. *PLoS One*, v.10(3), mar. 2015.

REY, L. *Parasitologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856p, 2001.

ROBLEDO, G., GONZÁLEZ, C. I., MORILLO, C., *et al.* Association study of PTPN22 C1858T polymorphism in *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Antigens*. v.69(3), p.261-4, 2007.

ROGEZ, H. *Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação*. Belém: EDUFPA; 2000.

SÁEZ-ALQUÉZAR, A., LUQUETTI, A. O., BORGES-PEREIRA, J., *et al.* Estudo multicêntrico: avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil, para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Patol. Clín. Trop.* v.26, p.343-374, 1997.

SANTOS, A. H., SILVA, I. G., RASSI, A. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e artificial, em chagásicos crônicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.28, p.367-73, 1995.

SAMBROOK, J.; FROTSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

SCHIJMAN, A. G., BISIO, M., ORELLANA, L., SUED, M., DUFFY, T., *et al.* International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. PLoS Negl Trop Dis. v.5, Janeiro, 2011.

SCHMUNIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*. The etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in the endemic and non-endemic countries. Transfusion. v.31, p.547-557, 1991.

SCHMUNIS, G. A. Tripanosomíase Americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. In: DIAS, J. C. P., COURA, J. R., editores. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora; p.11-23, 1997.

SCHOFIELD, C. J., JANIN, J., SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. Trends in Parasitol. v.22, p.583-588, 2006.

SHAW, J., LAINSON, R., FRAIHA, H. Epidemiology of the first autochthonous case of Chagas' disease recorded in Belém, Pará, Brazil. Rev. Saúde. Púb. v.3, p.153-7, 1969.

SHIKANAI-YASUDA, M. A., MARCONDES, C. B., GUEDES, L. A., SIQUEIRA, G. S., *et al.* Possible oral transmission of acute Chagas disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* v.33, p.351–7, 1991.

SILBER, A. M., BÚA, J., PORCEL, B. M., *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Experimental Parasitology.* v.85, p.225-232, 1996.

SILVA, R. A. M. S., SEIDL, A., RAMIREZ, L., *et al.* *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biologia, diagnóstico e controle. 1ªed, Corumbá, MS, 2002.

SILVA, F. C. Análise ROC. São José dos Campos, 2006. Disponível em: <http://www.dpi.inpe.br/~felipe/works/inpe/spr/roc_analyzes.pdf>. Último acesso em: 05 de abril de 2014.

SILVA, J. P. Doença de chagas e seus mecanismos alternativos de transmissão. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. São Paulo, 2007.

SILVA, A. R. Transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* em *Mus musculus*. 77p. [Dissertação] – Universidade de Brasília. Brasília, 2013.

SILVEIRA, A. C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cadernos de Saúde Pública,* v.16, sup.2, p.35-42, 2000.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.27 (Suppl. III), p.11-22, 1994.

SILVEIRA, A. C., DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial. v.44, Suplemento II, 2011

SIMONSON, A. B., SERVIN, J. A., SKOPHAMMER, R. G., HERBOLD, C. W., *et al.* Decoding the genomic tree of life. *PNAS.* v.102(1), p.6608-13, 2005.

SOARES, M. B. P., SANTOS, R. R. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.94 (Suppl. I): p. 257-262, 1999.

SOUSA, A. O. Transferência de DNA de *Trypanosoma cruzi* para retrotransposons line-1 de camundongos chagásicos tratados com nitroderivado benzonidazol. 119p., [Tese] — Universidade de Brasília. Brasília, 2012.

SOUZA, A. G. C. *et al.* Fruteiras da Amazônia. Embrapa - CPAA, Manaus, 1996.

SOUZA, D. do S. M. de, MONTEIRO, M. R. de C. C. Manual de Recomendações para Diagnóstico: Tratamento e Seguimento Ambulatorial de Portadores de doença de Chagas. 50p. Belém, 2013 .

SWETS, J. A. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science.* v.240(4857), p.1285 –1293, 1988.

TAFURI, W.L. Immunopathology of Chagas disease – A historical overview. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.94, Suppl (1), p.247-248, 1999.

TATTO, E., MENEZES, J. A., KITAGAWA, B. Y., FREITAS, D. R., *et al.* Acute Chagas disease (ACD) outbreak related to sugar cane drunk in Santa Catarina State, south Brasil. In: Abstracts of the 56th Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene; Nov., 4–8; Philadelphia. Philadelphia: The Society; 2007.

TEIXEIRA, A. R. L. Doença de Chagas e outras doenças por tripanossomas. Editora Universidade de Brasília. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Brasília. 1987:161.

TEIXEIRA, S. M.; RUSSELL, D. G.; KIRCHHOFF, L. V. *et al.* A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 20509-20516, 1994.

TEIXEIRA, A. R. L. Patologia da doença de Chagas humana. In: Doença de Chagas e evolução. Editora UnB, p.89-101, 2007.

TEIXEIRA, A. R., HECHT, M. M., GUIMARO, M. C., *et al.* Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*. v.24, nº.3, p.592-630, 2011.

TEIXEIRA, A. R., GOMES, C., NITZ, N., SOUSA, A. O., *et al.* *Trypanosoma cruzi* in the chicken model: Chagas-like heart disease in the absence of parasitism. *PLoS Negl. Trop. Dis.* v.5(3), 2011.

TELES, W. de S. Avaliação epidemiológica e laboratorial da doença de chagas em área rural de Sergipe. [Dissertação] - Universidade Tiradentes. p.79. Aracaju, 2013.

THOMAZ-SOCCOL, V.; BARNABÉ, C.; CASTRO, E. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: isoenzyme analysis suggests the presence of an active Chagas sylvatic cycle of recent origin in Paraná State, Brazil. *Exp. Parasitol.* 100, p.81-86, 2002.

TOLEDO, M. J., CARNEIRO, C. M., BAHIA, M. T., MACHADO-COELHO, G. L., VELOSO, V. M., BARNABÉ, C., *et al.* Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp. Parasitol.* v.100, p.161-172, 2002.

TOLEDO, M. J., BAHIA, M. T., CARNEIRO, C. M., MARTINS-FILHO, O. A., TIBAYRENC, M., BARNABÉ, C., *et al.* Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.47, p.223-230, 2003.

TOO, H. P. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. *Mol. Brain. Res.* v.114(2), p.146-53, 2003.

TRUC, P., JAMONNEAU, V., CUNY, G., FREZIL, J. L. Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bull World Health Organ.* v.77, p.745-748, 1999.

UMEZAWA, E. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas disease in Brazil (Catolé da Rocha, Paraíba). *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz.* v.91, p.87-93, 1996.

UMEZAWA, E. S., SILVEIRA, J. F. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz. v.94, suppl.1, p.285-288, 1999.

VAGO, A. R., ANDRADE, L. O., LEITE, A. A., d'AVILA REIS, D., *et al.* Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. Am. J. Pathol. v.156, p.1805-1809, 2000.

VALENTE, S. A., VALENTE, V. C., FRAIHA NETO, H. Transmissão da doença de Chagas: como estamos? Rev. Soc. Bras. Med. Trop.v.32, Suppl II, p.51–5, 1999.

VALENTE, S. A. S., VALENTE, V. C., PINTO, A. Y. N. Por que ocorrem episódios familiares de doença de Chagas associado à transmissão oral na Amazônia brasileira? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 35(I):165. In: Anais do 38^a Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2002; I. Foz do Iguaçu: Soc. Bras. de Med. Trop., 2002.

VALENTE, S. A., VALENTE, V. C., PINTO, A. Y. Epidemiologia e transmissão oral da doença de Chagas na Amazônia brasileira. In: Informe de la consulta técnica em epidemiologia, prevencion y manejo de la transmision de la enfermedad de chagas como enfermedad transmitida por alimentos (ETA). Washington: OPAS/OMS. p.21–6, 2006.

VERGARA, V. *et al.* Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.46, n.1, p.39-43, Jan. 1992.

VIRREIRA, M., MARTINEZ, S., ALONSO-VEGA, C., *et al.* Amniotic fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.75, p.1082–1084, 2006.

VIRREIRA, M., TORRICO, F., TRUYENS, C., ALONSO-VEGA, C., *et al.* Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.68, p.574–582, 2003.

VIRREIRA, M., TRUYENS, C., ALONSO-VEJA, C., BRUTUS, L., JIJENA, J., *et al.* Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.77(1), p.102–106, 2007.

VOLLER, A., DRAPPER, C., BIDWELL, DE *et al.* Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. *Lancet* 1: p.426-428, 1975.

WENDEL, S. Risco da transmissão da infecção por *Trypanosoma cruzi* por via transfusional no Brasil. [Tese]. Faculdade de Medicina da USP, SP. 404p., 2005.

WILLIAMS, N. G., SCHOFIELD, C. J. The role of temperature in flight initiation of triatomine bugs. *Transact. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* v.79, p.282, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease, Brazil. *Wkly Epidemiol Rec* 2000; 75:153-155.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 905. Geneve, 2002. 109p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests. WHO, Geneva, p.2–3, Jul., 2007

YANG, S., ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, imitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis.* v.4, p.337e 48, 2004.

YIN, J. A. L. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Pract. Res. Clin. Hematol*, v. 15, n. 1, p. 119-35, 2002.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitology Internacional*, São Paulo, v.57, n.2, p.105-109, 2007.

ZINGALES, B., ANDRADE, S. G., BRIONES, M. R. S., *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraespecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.104, p.1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Revista da Biologia.* 6b: p.44-48, 2011.

ZINGALES, B., MILES, M. A., CAMPBELL, D. A. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.*, v.12, ed.2, p.240–253 Mar., 2012.

ZULANTAY, I., HONORES, P., SOLARI, A., APT, W., *et al.* Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v.48, p.253–257, 2004.

ZWEIG, M. H., CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* v.39, p.561–577, 1993.

ANEXOS

ANEXO 1 -	MEIOS DE CULTURA PARA <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	139
ANEXO 2 -	TABELA DE COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE <i>T. cruzi</i>	141
ANEXO 3 -	VALORES DE Ct PARA AS AMPLIFICAÇÕES DE TCZ1/TCZ2 E EP1F/EP1R EM AMOSTRAS DE PACIENTES PACIENTES.....	144

ANEXO 1 - MEIOS DE CULTURA PARA *Trypanosoma cruzi*

1.1. TAMPÃO T.E.

Tris-HCl	10 mM
EDTA.....	0,1 mM

- Prepara-se Tris-HCl 1 M (24,23 g em 200 mL de água ultrapura), ajusta-se o pH para 8,0.
- Prepara-se o EDTA 0,5 M (37,22 g em 200 mL de água ultrapura), ajusta-se o pH para 8,0.
- Adiciona-se 1 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0 e 200 µL de EDTA 0,5 M pH 8,0 e coloca-se em 98,8 mL de água ultrapura.
- Autoclavar e guardar em geladeira.

1.2. SOLUÇÃO DE SDS 10%

SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) PM 238,38.....	10 g
Água ultrapura.....	100 mL

- Coloca-se todos os reagentes em um recipiente, e deixa no agitador magnético até total dissolução do pó.
- Autoclavar e armazenar em frasco âmbar em temperatura ambiente.

1.3. SOLUÇÃO DE PROTEINASE K

- Colocar 5 mL de solução de diluição de Proteinase K pH 7,5 filtrada (filtro 0,22 µm) (tubo de *Falcon*) no frasco contendo 100 mg da enzima pó.
- Acondicionar 20 µL da solução preparada em frascos de criobiologia estéreis e guardar em freezer a – 20 °C.

1.4. TAMPÃO T.E.N

Tris	10 mM
EDTA.....	10 mM
NaCl	50 mM

- Dissolver o Tris em água destilada;
- Corrigir o pH para 8,0 com HCl concentrado;
- Colocar o EDTA e homogeneizar em agitador magnético;
- Acrescentar NaCl;
- Acrescentar água ultra pura para 198 mL e corrigir o pH para 8,0 com NaOH;
- Completar o volume para 200 mL;
- Autoclavar e conservar em geladeira;

1.5. TAMPÃO DE LISE (100 mL)

Tris-HCl 1 M pH 8,0	1 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0.....	20 mL
SDS 10%.....	5 mL
Água ultrapura	74 mL

**ANEXO 2 – TABELA DE COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS PARA
DETERMINAÇÃO DE *T. CRUZI***

PACIENTES	IFI	Elisa	PCR	RT_PCR	
				TCZ1/TCZ2	EP1F/EP1R
Paciente 4	R	R	POS	POS	POS
Paciente 6	R	R	POS	POS	POS
Paciente 7	R	R	POS	POS	POS
Paciente 8	R	R	NEG	NEG	NEG
Paciente 21	R	R	NEG	NEG	POS
Paciente 22	R	R	NEG	NEG	POS
Paciente 23	R	R	NEG	NEG	POS
Paciente 24	R	R	POS	NEG	POS
Paciente 25	R	R	POS	POS	POS
Paciente 29	R	R	NEG	POS	POS
Paciente 30	R	R	POS	NEG	POS
Paciente 31	R	R	POS	POS	POS
Paciente 32	R	R	POS	NEG	POS
Paciente 33	R	R	NEG	NEG	NEG
Paciente 34	R	R	NEG	POS	POS
Paciente 36	R	R	NEG	POS	POS
Paciente 37	R	R	NEG	POS	NEG
Paciente 38	R	R	NEG	POS	NEG
Paciente 40	R	R	POS	POS	NEG
Paciente 41	R	R	NEG	POS	POS
Paciente 42	R	R	NEG	NEG	POS
Paciente 44	NR	NR	NEG	POS	POS
Paciente 46	R	R	NEG	NEG	POS
Paciente 49	R	R	POS	NEG	NEG
Paciente 54	R	R	POS	POS	POS
Paciente 55	R	R	NEG	POS	POS
Paciente 56	R	R	POS	POS	POS
Paciente 59	R	R	POS	POS	NEG
Paciente 61	R	R	POS	POS	POS
Paciente 62	R	R	POS	POS	NEG
Paciente 64	R	R	POS	POS	NEG

Paciente 65	R	R	POS	POS	NEG	
Paciente 66	NR	NR	POS	POS	POS	
Paciente 67	NR	NR	NEG	NEG	NEG	
Paciente 68	R	R	POS	POS	NEG	
Paciente 26S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 39S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 41S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 42S	NR	NR	***	POS	POS	
Paciente 43S	R	R	POS	POS	NEG	
Paciente 44S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 45S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 46S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 49S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 50S	NR	INDET	NEG	POS	NEG	
Paciente 51S	NR	INDET	NEG	POS	POS	
Paciente 58S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 59S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 60S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 61S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 62S	R	INDET	POS	POS	POS	
Paciente 63S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 70S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 73S	NR	INDET	POS	POS	POS	
Paciente 79S	R	INDET	POS	POS	NEG	
Paciente 35S	R	R	POS	POS	NEG	
Paciente 36S	R	R	POS	POS	NEG	
Paciente 29S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 30S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 76S	R	NR	NEG	POS	POS	
Paciente 78S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 55S	R	R	POS	POS	NEG	
Paciente 21S	NR	NR	***	POS	POS	
Paciente 67S	NR	NR	NEG	POS	POS	
Paciente 65S	R	R	POS	POS	POS	
Paciente 66S	NR	NR	POS	POS	POS	
TOTAL	56	53	44		54	48

CONTACTOS							
Paciente 1C	NR	NR	POS	POS		POS	
Paciente 2C	NR	NR	POS	POS		NEG	
Paciente 5C	NR	NR	POS	POS		NEG	
Paciente 26C	NR	NR	POS	POS		POS	
Paciente 27C	NR	NR	NEG	NEG		POS	
Paciente 28C	NR	NR	NEG	NEG		POS	
Paciente 35C	NR	NR	POS	POS		POS	
Paciente 39C	NR	NR	NEG	POS		POS	
Paciente 45C	NR	NR	POS	POS		NEG	
Paciente 48C	R	R	NEG	POS		POS	
Paciente 50C	NR	R	POS	POS		POS	
TOTAL		1	2	7		9	8

ANEXO 3 - VALORES DE Ct PARA AS AMPLIFICAÇÕES DE TCZ1/TCZ2 E EP1F/EP1R EM AMOSTRAS DE PACIENTES

PACIENTES	Ct TCZ1/TCZ2	Ct Ep1F/Ep1R
Paciente 4	37,7	44
Paciente 6	38,7	36,3
Paciente 7	32,8	38
Paciente 8	0	0
Paciente 21	0	44
Paciente 22	0	45
Paciente 23	0	45,5
Paciente 24	0	44,5
Paciente 25	35,5	46
Paciente 29	33,2	48
Paciente 30	0	44
Paciente 31	31,9	48
Paciente 32	0	42
Paciente 33	0	0
Paciente 34	32,8	48
Paciente 36	34,2	46
Paciente 37	36	0
Paciente 38	32,7	0
Paciente 40	31,2	0
Paciente 41	30,6	47
Paciente 42	0	44,5
Paciente 44	31,6	46,6
Paciente 46	0	44
Paciente 49	0	0
Paciente 54	39,4	47
Paciente 55	44,4	45,4
Paciente 56	42,8	48
Paciente 59	31,4	0
Paciente 61	34,6	48,5
Paciente 62	35	0
Paciente 64	34,7	0

Paciente 65	44	0
Paciente 66	32,6	38,5
Paciente 67	0	0
Paciente 68	41,6	0
Paciente 26S	30,9	40
Paciente 39S	33,3	39,6
Paciente 41S	30	40,2
Paciente 42S	30,3	42,7
Paciente 43S	36,2	0
Paciente 44S	31,7	38,2
Paciente 45S	27,6	37,4
Paciente 46S	33,1	45,6
Paciente 49S	28,4	36,8
Paciente 50S	32,5	0
Paciente 51S	23,2	28,5
Paciente 58S	31,7	36,4
Paciente 59S	14,8	26,4
Paciente 60S	19,8	27,6
Paciente 61S	17,9	26,6
Paciente 62S	22	27,9
Paciente 63S	23,2	32
Paciente 70S	20,6	28,7
Paciente 73S	29,1	34,8
Paciente 79S	33,5	0
Paciente 35S	31,7	0
Paciente 36S	28,4	0
Paciente 29S	27,7	36,2
Paciente 30S	30,9	35
Paciente 76S	30,3	43,8
Paciente 78S	29	46
Paciente 55S	30,1	0
Paciente 21S	27,1	32,1
Paciente 67S	30,4	37,6
Paciente 65S	26,4	34,1
Paciente 66S	28,6	35,7

CONTATOS		
Paciente 1C	13,6	45,6
Paciente 2C	34,9	0
Paciente 5C	24,2	0
Paciente 26C	44,5	44
Paciente 27C	44	45
Paciente 28C	48	44,5
Paciente 35C	0	43,5
Paciente 39C	33,3	48,5
Paciente 45C	40,2	0
Paciente 48C	38,3	43,5
Paciente 50C	46,2	45
