

VERA LÚCIA TEIXEIRA DE FREITAS

**Avaliação dos níveis de parasitemia por PCR em tempo real em
pacientes com doença de Chagas crônica e pacientes com co-infecção
HIV – *Trypanosoma cruzi*, com e sem reativação da doença de
Chagas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof^ª. Maria Aparecida Shikanai Yasuda

São Paulo

2009

AOS PACIENTES

Por toda colaboração.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Ao Jorge,

Obrigada por estarem sempre ao meu lado

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Maria Aparecida Shikanai Yasuda

Por toda compreensão, incentivo, dedicação e, sobretudo pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Aos companheiros de laboratório: Alexei H. Bantu, Ana Carolina Mamana, Ana Carolina Mourão Roque, Aya Sadahiro, Bianca Cerretti, Claudia de Abreu Fonseca, Claudia Ubida, Célia Regina Furuchó, Constância D. L. Lorente, Diego Petian, Érica Cano Passos, Edite Yamashiro Kanashiro, Érika Y. Shimoda, Marcello Magri, Márcia Andréia Ferreira, Márcia Yoshida, Paula Keiko Sato, Priscila Mayumi, Sheila Cristina Vicente, Tatiane Decaris Molina, Telma Miuki Oshiro pelo companheirismo e apoio.

A Ana Marli C. Sartori, Karim Yaqub Ybraim, Noemia de Carvalho Barbosa e demais médicos do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias-FMUSP / Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias – HC-FMUSP pelo encaminhamento dos pacientes.

Ao Sr. José Maria Biazon e Dalva de Mello Ferreira pela agradável convivência durante minha permanência no serviço de coleta.

Roseli Santos Freitas, Antonia Chagas e à Judith Maria de Jesus, pela amizade e carinho.

Vânia Regina Miguel, Roseli Antônia Santo e Rosemeire Ap Moraes Ribeiro secretárias da Pós-Graduação, sempre prestativas nas informações e orientações dadas.

A todos que de alguma forma auxiliaram-me na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Investigação Médica-LIM 48, à Fundação Faculdade de Medicina e à Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Lista de Siglas	
	Lista de Figuras	
	Lista de Tabelas	
	Resumo	
	Summary	
1.	INTRODUÇÃO	02
2.	OBJETIVOS	17
2.1.	Objetivos Gerais	17
2.2.	Objetivos Específicos	17
3.	MÉTODOS	18
3.1.	Casuística	19
3.2.	Critérios de inclusão	19
3.2.1.	Grupo crônico	19
3.2.2.	Grupo com co-infecção HIV/ <i>T. cruzi</i>	20
3.2.3.	Grupo com co-infecção HIV/ <i>T. cruzi</i> e reativação da doença de Chagas	20
3.2.4.	Grupo controle: indivíduos aparentemente sadios	21
3.3.	Coleta de sangue	21
3.4.	Provas parasitológicas	22
3.4.1.	Hemocultura	22
3.4.2.	Xenodiagnóstico	22
3.4.3.	Exame microscópico direto	23
3.5.	Provas Moleculares	24

3.5.1.	Extração de DNA	24
3.5.1.1.	Extração em tampão Guanidina HCl/EDTA para sangue periférico	24
3.5.1.2.	Extração QIAamp® DNA mini para creme leucocitário com e sem hemácias e líquido	24
3.5.1.3.	Quantificação do DNA total extraído	25
3.5.2.	PCR qualitativo	25
3.5.3	PCR quantitativa competitiva	26
3.5.3.1.	Obtenção do DNA competidor	26
3.5.3.2.	PCR competitiva	27
3.5.4.	PCR em tempo real	28
3.5.5.	Visualização do produto amplificado	28
3.6.	Distribuição das amostras segundo os grupos estudados e exames realizados	28
3.7.	Análise estatística	30
3.7.1.	Comparação dos testes usados para diagnóstico	30
3.7.2.	Correlação entre os ensaios quantitativos	30
3.7.3.	Comparação dos dados qualitativos entre os grupos de pacientes	31
3.7.4.	Comparação dos dados quantitativos entre os grupos de pacientes	31
4.	RESULTADOS	32
4.1.	Padronização dos ensaios moleculares	33
4.1.1.	PCR qualitativa S35/36	33
4.1.2.	PCR em tempo real TCZ3/TCZ4	34
4.2.	Dados demográficos: Idade e gênero	36
4.3.	Resultados qualitativos: Testes parasitológicos e PCR S35/36	37
4.4.	Ensaio moleculares quantitativos	40

4.4.1.	PCR competitiva	40
4.4.1.1.	Comparação entre testes parasitológicos e PCR competitiva	43
4.4.2	PCR em tempo real	45
4.4.2.1.	Comparação qualitativa entre PCR em tempo real, PCR competitiva e os testes parasitológicos	48
4.5.	Correlação entre os ensaios quantitativos	50
4.5.1.	Hemocultura (% de tubos positivos) <i>versus</i> xenodiagnóstico (% de ninfas positivas)	50
4.5.2.	PCR competitiva (<i>T. cruzi</i> /mL de sangue) <i>versus</i> xenodiagnóstico (% de ninfas positivas)	51
4.5.3.	PCR competitiva (<i>T. cruzi</i> /mL de sangue) <i>versus</i> Hemocultura (% de tubos positivos)	52
4.5.4.	PCR em tempo real (<i>T. cruzi</i> /mL de sangue) <i>versus</i> xenodiagnóstico (% de ninfas positivas)	53
4.5.5.	PCR em tempo real (<i>T. cruzi</i> /mL de sangue) <i>versus</i> Hemocultura (% de tubos positivos)	54
4.5.6.	PCR em tempo real (<i>T. cruzi</i> /mL de sangue) <i>versus</i> PCR competitiva (<i>T. cruzi</i> /mL de sangue)	55
4.5.7.	Sumário das análises de correlação (Coeficiente de Correlação de Spearman) entre xenodiagnóstico, hemocultura, PCR competitiva, e PCR em tempo real	56
4.6.	Análise comparativa dos grupos	57
4.6.1.	Dados qualitativos	57
4.6.2.	Dados quantitativos	59
4.6.2.1.	PCR competitiva	59
4.6.2.2.	PCR em tempo real	61
4.6.2.3.	PCR em tempo real – Grupo RE	63
4.7.	Correlação entre parasitemia e variáveis selecionadas nos pacientes HIV +: células T CD4+, CD8+ e carga viral	65

4.7.1.	Parasitemia por PCR em tempo real e carga viral	65
4.7.2.	Parasitemia por PCR em tempo real e células T CD4+ e CD8+	67
5.	DISCUSSÃO	71
6.	CONCLUSÕES	80
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8.	ANEXOS	97

LISTA DE SIGLAS

CO	Pacientes com co-infecção HIV- <i>T. cruzi</i>
CR	Pacientes com doença de Chagas crônica
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HÁ	Hemaglutinação
HC	Hemocultura
HCl	Àcido Clorídrico
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
IFI	Imunofluorescência Indireta
kDNA	Kinetoplast DNA
KOAc	Acetato de Potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LIT	Liver Infusion Triptone
MD	Microscopia Direta
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NL	Controles sem doença de Chagas
pb	Pares de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction
PCR-C	PCR competitiva
QBC	Quantitative Buffy Coat
qPCR-TR	PCR quantitativa em tempo real
RE	Pacientes com co-infecção HIV- <i>T. cruzi</i> com reativação da doença de Chagas
SDS	Sodiun Dodecyl Sulfate
SG	Sangue
XD	Xenodiagnóstico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** PCR analítico, utilizando diluições seriadas de DNA de epimastigota extraído de cepa Y, considerando a massa de DNA. Amostras: 1) Padrão de Peso Molecular gene Ruler tm 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2) Controle negativo da sala de mistura reativa; 3) Controle negativo da sala de aplicação de DNA. 4) 2×10^{-13} ; 5) 5×10^{-14} ; 6) 2×10^{-14} ; 7) 5×10^{-15} ; 8) 2×10^{-15} ; 9) 5×10^{-16} ; 10) 2×10^{-16} ; 11) 5×10^{-17} 33
- Figura 2.** Padronização da PCR em tempo real: **A.** Diluições seriadas de DNA de *T. cruzi* de 10^5 até 1 parasito/ μ L de DNA, threshold = 0,380 de fluorescência. **B.** Gráfico demonstrando a temperatura de melting de $88,6 \pm 0,3^\circ$ C. Curva Padrão entre concentração de parasito e “CT” (cycle threshold), valor da correlação $r^2 = 0,996$. 35
- Figura 3.** Ensaio de PCR competitiva em amostra de DNA de um paciente com doença crônica. Amostras: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler tm 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de mistura reativa; 3. Controle negativo da sala de aplicação de DNA. 4. Paciente com doença de Chagas crônica (330 pb); 5 – 8. Paciente (330 pb) com acréscimo de DNA competidor (280 pb): 0,15 fg; 1,5 fg; 15 fg e 150 fg, respectivamente. Amostra 6. Ponto de equivalência. 41
- Figura 4.** Ensaio de PCR competitiva em amostra de DNA de um paciente com co-infecção HIV/*T. cruzi*. Amostras: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler tm 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de aplicação de DNA. 3. Paciente com co-infecção (330 pb); 4 – 7. Paciente (330 pb) com acréscimo de DNA competidor (280 pb): 0,15 fg; 1,5 fg; 15 fg e 150 fg, respectivamente. Amostra 7. Ponto de equivalência. 42
- Figura 5.** Curvas de quantificação e da temperatura de dissociação observadas em 6 pacientes com doença de Chagas crônica (**5A e 5B**). As linhas contínuas mais grossas representam os pacientes, exceto a de cor preta que é o controle positivo 5×10^{-14} . As linhas tracejadas representam amostras de controles sem a doença de Chagas e a linhas cinzas mais finas representam dois controles negativos: água aplicada nas salas de preparo dos reagentes e de aplicação do DNA. 46
- Figura 6** Curvas de quantificação e da temperatura de dissociação observadas em 5 pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi* (**6A e 6B**). As linhas contínuas mais grossas representam os pacientes, exceto a de cor preta e cinza que representam os controles positivos 5×10^{-14} e 5×10^{-15} respectivamente. As linhas tracejadas representam amostras de controles sem a doença de Chagas e a linhas cinzas mais finas 47

representam dois controles negativos: água aplicada nas salas de preparo dos reagentes e de aplicação do DNA.

- Figura 7.** Correlação entre hemocultura (% de tubos positivos) e xenodiagnóstico (% de ninfas positivas) em 87 amostras. Coeficiente de correlação de Spearman ($r = 0,398$ e $P < 0,001$). 50
- Figura 8** Correlação entre número de cópias de *T. cruzi*/mL (\log_{10}) de sangue e % de ninfas positivas por xenodiagnóstico em 35 amostras. Coeficiente de correlação de Spearman ($r = 0,456$ e $P = 0,006$). 51
- Figura 9.** Correlação entre número de cópias de *T. cruzi*/mL (\log_{10}) de sangue por PCR competitiva e % de tubos positivos por hemocultura em 39 amostras. Coeficiente de correlação de Spearman ($r = 0,270$ e $P = 0,106$). 52
- Figura 10.** Correlação entre número de cópias de *T. cruzi*/mL (\log_{10}) de sangue por PCR em tempo real e % de ninfas positivas por xenodiagnóstico em 57 amostras. Coeficiente de correlação de Spearman ($r = 0,408$ e $P = 0,002$). 53
- Figura 11.** Correlação entre número de cópias de *T. cruzi*/mL de sangue (\log_{10}) por PCR em tempo real e % de tubos positivos por hemocultura em 59 amostras. Coeficiente de correlação de Spearman ($r = 0,251$ e $P = 0,056$). 54
- Figura 12.** Correlação entre 38 amostras da parasitemia obtida por PCR competitivo e PCR em tempo real. Coeficiente de correlação de Spearman ($r = 0,724$ e $P < 0,001$). 55
- Figura 13.** Número de *T. cruzi*/mL (\log_{10}) por PCR competitiva em sangue segundo os grupos CR (n=17); CO (n=16) e RE (n=5). A linha representa a mediana dos valores. Kruskal Wallis $P < 0,001$ e a comparação entre os grupos: CR x CO $P < 0,001$; CR x RE, $P = 0,01$; CO x RE, $P = 0,02$ (Teste de Mann Whitney). 60
- Figura 14.** Número de *T. cruzi*/mL (\log_{10}) por PCR em tempo real em sangue segundo os grupos CR (n=29); CO (n=26) e RE (n=5). A linha representa a mediana dos valores. Kruskal Wallis $P < 0,001$ e a comparação entre os grupos: CR x CO, $P = 0,03$; CR x RE, $P < 0,001$; CO x RE, $P = 0,01$ (Mann Whitney). 62
- Figura 15.** Resultados observados por PCR em tempo real, exame direto (do sedimento ou QBC), xenodiagnóstico e cultura em amostras de sangue (SG) e/ou líquido (LCR) coletadas de 5 pacientes com reativação, 3 no SNC e 2 no sangue. 64
- Figura 16.** Correlação entre parasitemia observada por PCR em tempo real (T. 66

cruzi/mL de sangue) e carga viral HIV (cópias de RNA/mL de plasma) em 20 amostras de pacientes com co-infecção e reativação da doença de Chagas. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = 0,619 e $P = 0,004$.

- Figura 17.** Correlação entre parasitemia obtida por PCR em tempo real (*T. cruzi*/mL de sangue) e número de células T CD4 + (células / mm³) em 28 amostras de pacientes com co-infecção e reativação da doença de Chagas. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = - 0,542 e $P = 0,003$. 67
- Figura 18.** Correlação entre parasitemia obtida por PCR em tempo real (*T. cruzi*/mL de sangue) e número de células T CD8 + (células/mm³) em 28 amostras de pacientes com co-infecção e reativação da doença de Chagas. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = 0,069 e $P = 0,727$. 68
- Figura 19.** Correlação entre parasitemia obtida por PCR em tempo real (*T. cruzi*/mL de sangue) e a razão entre o número de células T CD4 + e T CD8 + em 28 amostras de pacientes com co-infecção e reativação da doença de Chagas. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = - 0,702 e $P < 0,001$. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição das amostras coletadas de 91 pacientes e 58 indivíduos saudáveis segundo os grupos, as provas de hemocultura (HD), xenodiagnóstico (XD), parasitológico indireto (PI). Microscopia direta (MD); PCR qualitativa S35/36, PCR competitiva (PCR-C) e PCR em tempo real (PCR-TR)	29
Tabela 2.	Distribuição de 91 amostras coletadas de pacientes nos grupos crônico (CR), co-infectado (CO) e reativado (RE) de acordo com gênero (%) e idade: média (desvio padrão DP), valor máximo e mínimo e mediana.	36
Tabela 3.	Positividade (%) de 91 amostras de sangue avaliadas por PCR S35/36, xenodiagnóstico (XD), hemocultura (HD), xenodiagnóstico ou hemocultura (PI) e exame microscópico direto (MD).	37
Tabela 4.	Comparação dos resultados da PCR qualitativa S35/S36, xenodiagnóstico, hemocultura e parasitológico indireto: xenodiagnóstico e/ou hemocultura, pelo teste de McNemar.	39
Tabela 5.	Análise dos resultados qualitativos da PCR competitiva, xenodiagnóstico, hemocultura e parasitológico indireto: xenodiagnóstico e/ou hemocultura pelo teste de McNemar.	44
Tabela 6.	Comparação dos resultados qualitativos observados pela PCR em tempo real, PCR competitiva, xenodiagnóstico, hemocultura e parasitológico indireto: xenodiagnóstico e hemocultura pelo teste de McNemar.	49
Tabela 7.	Sumário da análise dos dados quantitativos observados nos ensaios de hemocultura (HC), xenodiagnóstico (XD), PCR competitiva (PCR-C) e PCR em tempo real (PCR-RT) pelo Coeficiente de Correlação de Spearman.	56
Tabela 8.	Positividade dos ensaios qualitativos: PCR S35/36, xenodiagnóstico (XD), hemocultura (HC) e Parasitológico indireto (xenodiagnóstico e hemocultura), nos grupos: crônico N=57 (CR) e co-infectado com e sem reativação N = 34 (CO + RE).	57
Tabela 9.	Análise da diferença entre os grupos crônico e co-infectado + reativado em relação aos exames de Xenodiagnóstico, Hemocultura, Parasitológico indireto (Xenodiagnóstico e Hemocultura) e PCR S35/S36.	58
Tabela 10.	Variação da parasitemia no ensaio de PCR competitiva, segundo	59

os parâmetros média, mediana, máximo e mínimo, considerando os grupos de pacientes: crônicos (N = 17); com co-infecção (N = 16) e com reativação da doença de Chagas (N = 5).

Tabela 11. Variação da parasitemia no ensaio de PCR em tempo real, segundo os parâmetros média, mediana, máximo e mínimo, considerando os grupos de pacientes: crônicos (N = 29); com co-infecção (N = 26) e com reativação da doença de Chagas (N = 5). 61

Freitas, VLT. **Avaliação dos níveis de parasitemia por PCR em tempo real em pacientes com doença de Chagas crônica e em pacientes com co-infecção HIV – *Trypanosoma cruzi*, com e sem reativação da doença de Chagas.** São Paulo, 2009. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Introdução: A reativação da doença de Chagas crônica, descrita em aproximadamente 20% dos pacientes co-infectados por HIV/*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), apresenta-se geralmente como doença grave, com meningoencefalite e miocardite. O diagnóstico baseia-se em métodos diretos, no sangue ou outro material biológico, podendo ser estabelecido em exame histopatológico, sendo associado à elevada parasitemia ou a multiplicação de *T. cruzi* nos tecidos comprometidos. A letalidade é elevada principalmente nos pacientes que não receberam pelo menos 30 dias de terapêutica. Dessa forma métodos mais sensíveis e mais rápidos são necessários visando a detecção precoce do parasito. A proposta deste estudo é avaliar o papel da PCR em tempo real na determinação do nível de parasitemia em pacientes infectados por HIV com e sem reativação da doença de Chagas.

Métodos: Noventa e uma amostras coletadas de pacientes com doença de Chagas 57 com doença de Chagas crônica (CR), 34 com co-infecção HIV-*T. cruzi*, destes, 29 sem reativação (CO) e 5 com reativação da doença de Chagas foram analisadas por provas qualitativas: PCR para seqüência de DNA do cientoplasto (kDNA), hemocultura e xenodiagnóstico, e provas quantitativas: PCR em tempo real (qPCR-TR), PCR competitiva (PCR-C), hemocultura considerando % de tubos positivos e xenodiagnóstico com % de ninfas positivas. As variáveis quantitativas moleculares e parasitológicas foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman, bem como as variáveis moleculares, número de *T. cruzi*/mL e carga viral HIV, número de *T. cruzi*/mL e nível de células CD4 +/mm³, CD8 +/mm³ e razão CD4 +/CD8 +.

Resultados: Foram observadas diferenças significantes entre pacientes co-infectados com e sem reativação. A maior parasitemia, detectada por qRT-PCR, foi em

pacientes com reativação da doença de Chagas crônica (média 102235,3; mediana 51333,3 e número de *T. cruzi*/mL de sangue entre 939 e 352000), seguido pelos pacientes com co-infecção (média 255; mediana 54,3 e parasitemia entre 0 e 2405 *T. cruzi*/mL de sangue) e finalmente pelo grupo de pacientes com doença crônica (média 14,3; mediana 1; e parasitemia entre 0 e 146 *T. cruzi*/mL de sangue). O coeficiente de correlação de Spearman mostrou correlação entre xenodiagnostico x hemocultura, e entre xenodiagnostico x PCR competitiva ou PCR em tempo real. Houve maior correlação entre PCR competitiva x PCR em tempo real, e número de parasitos e as variáveis: carga viral do HIV, número de células T CD4 + ou razão CD4 +/CD8 +.

Conclusões: RT-PCR foi capaz de distinguir entre pacientes co-infectados HIV/*T. cruzi* com e sem reativação sendo proposta sua utilização como marcador para terapia preemptiva na reativação da doença de Chagas em pacientes com HIV/*T. cruzi*. Adicionalmente, o nível de parasitemia foi correlacionado positivamente com carga viral e negativamente com nível de células T CD4+/mm³ de sangue e razão CD4+/CD8+.

Descritores: 1. *Trypanosoma cruzi* 2. Infecções por HIV 3. Parasitemia 4. Reação em Cadeia da Polimerase

Freitas, VLT. **Real Time PCR for the evaluation of parasitemia in patients with chronic Chagas' disease and in HIV-*Trypanosoma cruzi* co-infection with or without reactivation.** São Paulo, 2009. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

SUMMARY

Background. The reactivation of chronic Chagas' disease, described in approximately 20% of HIV/*Trypanosoma cruzi* infected patients, is commonly expressed by severe and lethal meningoencephalitis and myocarditis. The gold standard for the reactivation diagnosis is based on direct methods, the parasite is observed by direct microscopic examination of fresh buffy coat or through the "Quantitative Buffy Coat", which can be applied to samples of cerebrospinal fluid or blood. The diagnosis of reactivation can be achieved by histological study, showing large numbers of parasites in tissue and acute inflammatory infiltrate. However diagnosis of reactivation is often difficult, it has been established in patients with high parasitemia, usually with severe clinical symptoms, this patients death before or during therapy. The purpose of this study was to evaluate the role of real time PCR for evaluation of the level of parasitemia on patients with HIV and *T.cruzi* infection with and without reactivation of Chagas disease.

Methods. Ninety-one samples from patients with Chagas disease, 57 with chronic Chagas' disease (CR), 34 with infection HIV/*T. cruzi*, 29 without reactivation (CO) and 5 with reactivation of Chagas' disease, were analyzed by qualitative methods: Polymerase chain reaction with kDNA S35/S36 sequence, xenodiagnosis and blood culture, and quantitative methods: Real-time PCR, competitive PCR, blood culture considering % of positive tubes, xenodiagnosis with % of positive nymphs.

Results: There were significant differences between groups, the highest parasitemia was observed in patients with reactivation of chronic Chagas' disease (mean 102,235.3; median 51,333.3 and number of *T. cruzi*/ml of blood between 939 and 352,000), followed by patients with co-infection (mean 255, median 54.3 and parasitemia 0 to 2405 *T. cruzi*/mL of blood) and finally by the group of patients with

chronic disease (mean 14.3, median 1 and parasitemia 0 to 146 *T. cruzi*/ml of blood). Spearman correlation coefficient showed correlation between xenodiagnosis x blood culture and between xenodiagnosis x competitive PCR or real time PCR. Stronger Spearman correlation index was found between cPCR x RT-PCR, number of parasites and the variables: HIV viral load or CD4 + number or CD4 +/CD8 + ratio

Conclusions. RT-PCR is able to distinguish between HIV/*T. cruzi* infected patients with or without reactivation and is proposed as a marker for preemptive therapy in Chagas disease reactivation. Additionally, the level of parasitemia was correlated positively with viral HIV load and negatively with CD4+/mm³ of the blood and CD4+/CD8+ ratio.

Descriptors: 1. *Trypanosoma cruzi* 2. HIV Infection 3. Parasitemia 4. Polymerase Chain Reaction

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A Doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelar da ordem Kinetoplastida, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), apresentando ampla distribuição no continente latino americano. Atualmente, estima-se aproximadamente 12-15 milhões de indivíduos infectados na América Latina (Dias et al, 2008), 1,8 a 2,4 milhões no Brasil (Akhavan 2000).

A aquisição da doença pela grande maioria dos pacientes com doença de Chagas no Brasil deu-se pelo contato com o vetor em zonas rurais. Nas décadas de 70 e 80, fatores sócio-econômicos desencadearam movimentos migratórios da população das zonas endêmicas para os grandes centros urbanos, estimando-se que 60% dos indivíduos infectados vivam em área urbana, onde outras formas de transmissão passaram a ser também consideradas como via transfusional e transplante de órgãos.

A implementação de programas de eliminação do vetor em países da América Latina na década de 90 (OPS, Doc. OPS/PNSP/92.18) resultou em diminuição significativa da incidência de novos casos. O Brasil já apresenta interrupção da transmissão pelo seu principal vetor *Triatoma infestans*, tendo recebido o Certificado da OPAS/OMS em 9 de junho de 2006 (Ministério da Saúde, 2006).

O risco de transmissão vetorial, porém, ainda existe. O protozoário circula entre vetores e mamíferos silvestres, em vários ecótopos no continente, nos quais há atividade humana, há relatos principalmente de infecção via oral. Casos de doença de Chagas aguda na região Amazônica tem sido registrados, Pinto et al (2008)

descrevem 233 casos no Pará, Amapá e Maranhão ocorridos entre 1988 e 2005, sendo que, a maioria, 78,5%, atribuída a surtos decorrentes de infecção oral.

Com a criação de uma legislação específica sobre a qualidade da hemoterapia (Decreto nº 95.721/1988 que regulamenta a Lei nº 7.649/1988) (Carrazzone et al, 2004), aumentou o grau de cobertura da triagem pré-transfusional (13% em 1980 para 99% em 2006) e houve uma melhora do padrão das provas sorológicas realizadas (Dias et al, 1998; 2008). Na transmissão por via transfusional, a prevalência da Doença de Chagas entre candidatos a doadores de sangue no Brasil, tem diminuído progressivamente, 4% em 1980 a 0,4% em 2006 (Dias et al, 2008). Segundo Wendel Neto, 2005, a análise de 13.383 amostras de bancos de sangue públicos e privados revelou uma prevalência de infecção por *T. cruzi* de 0,49% em candidatos a doadores de sangue no Brasil.

Outra forma de transmissão via congênita, também vem diminuindo como consequência da diminuição do número de mulheres infectadas em idade fértil (Dias et al, 2008).

Outra via transmissão seria decorrente do aumento de transplantes de órgãos sólidos e de células tronco-hematopoiéticas (TCTH), envolvendo doadores com doença de Chagas.

Este panorama demonstra um controle da Doença de Chagas no Brasil e em outros países da América Latina, porém há outras situações que ainda exigem atenção: casos de co-infecção *T. cruzi* e HIV e o aumento de transplantes de órgãos sólidos e de TCTH, envolvendo receptores com doença de Chagas que são submetidos a imunodepressão intensa e duradoura propiciando casos de reativação da doença de Chagas crônica. Além disso, em função da migração de indivíduos de

países endêmicos, a doença de Chagas é agora emergente em países desenvolvidos (Schmunis, 2007; Leiby et al, 2008; Lescure et al, 2008), não endêmicos, nos quais há registros de casos de infecção por via vertical e por transplante de órgãos (CDC 2001; 2006; Virreira et al 2007).

A reativação da doença de Chagas em pacientes com co-infecção por HIV/*T. cruzi*, apresenta-se sob forma grave, acometendo em 79% dos casos o sistema nervoso central e em menor frequência, 25%, o miocárdio (Sartori et al, 1995; Ferreira et al, 1997; Cohen et al, 1998; Sartori et al, 1998a; 1998b; Galhardo et al, 1999; Pagano et al, 1999; Santos S. et al, 1999; Silva et al, 1999; Lages-Silva et al, 2002; Vaidian et al, 2004; Yoo et al, 2004 Rivera et al, 2004). Há relatos de envolvimento de outros órgãos como trato gastro-intestinal, pericárdio (Ferreira et al, 1997), tegumento (Sartori et al, 1999), e também casos oligossintomáticos (Sartori et al, 2002b; 2007). Além, disso tem sido descrita elevada taxa de transmissão congênita ao feto (Nisida et al, 1999; Freilij et al, 1995a, 1995b). A reativação da doença de Chagas tem sido associada a alta mortalidade, muitos pacientes vão a óbito antes ou durante a terapia (Ferreira et al, 1997; Cohen et al, 1998; Sartori et al, 1998a; Rivera et al, 2004; Sartori et al, 2007).

Reativações da doença de Chagas observadas em pacientes submetidos à imunodepressão por drogas, em transplantes de órgãos ou à quimioterapia citotóxica em neoplasias ou doenças autoimunes, são descritas na literatura como miocardite, eritema nodoso, esofagite e reativação no sistema nervoso central (Bestetti et al, 2004; Fiorelli et al, 2005; d'Ávila et al, 2005; Benvenuti et al, 2005; Marchiori et al, 2007; Gallerano et al, 2007; Diez et al, 2007).

O padrão ouro para o diagnóstico da reativação, como na doença aguda, baseia-se em métodos diretos, sendo o parasito observado ao exame microscópico direto do creme leucocitário a fresco ou através do “Quantitative Buffy Coat” e microhematócrito (Freilij et al, 1983; Amato-Neto et al, 1998), que pode ser aplicado às amostras de líquido, sangue e creme leucocitário. O diagnóstico de reativação pode também ser realizado por estudo histológico, que demonstra padrão compatível com a doença aguda, evidenciando grande número de parasitos nos tecidos e infiltrado inflamatório agudo. O diagnóstico da reativação é por vezes difícil, sendo estabelecido em pacientes com alta parasitemia, com doença grave, sendo a letalidade próxima a 100% sem a terapia adequada (Ferreira et al, 1997; Santos S. et al, 1999; Sartori et al, 1998b; Silva et al, 1999).

Métodos de enriquecimento indireto são de elevada sensibilidade na doença aguda, porém tem sua aplicação dificultada para tal diagnóstico por ser também positiva na fase crônica (Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda, 2003), embora com menor sensibilidade: a hemocultura realizada sem repetições, é positiva de 25,7 a 55 % (Chiari et al, 1989; Fernandes et al, 1995; Mora 1996; Junqueira et al 1996; Gomes et al, 1999) e o xenodiagnóstico artificial, sem repetições, é positivo de 11,8 a 32 % (Santos et al, 1995; Pineda e Luquetti 1998; Santos et al, 1999; Borges-Pereira et al, 2008).

Uma modificação da técnica de xenodiagnóstico com leitura individual de ninfas permitiu identificar a percentagem de ninfas positivas e desta forma, monitorar o nível de parasitemia. Na co-infecção HIV e *T. cruzi* tem-se mostrado que uma elevada percentagem de ninfas positivas >30% é preditora de reativação da doença de Chagas em 50% dos casos (Sartori et al, 1999). Uma desvantagem em

relação ao xenodiagnóstico, apesar de se mostrar mais sensível que os métodos diretos, é o tempo necessário para a leitura final, pelo menos um mês. Além disso, exige criação e manutenção de insetos e técnicos treinados para a leitura individual das ninfas de triatomíneos.

Outros métodos que propiciariam um diagnóstico precoce têm sido sugeridos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que é capaz de amplificar quantidades mínimas de DNA. O genoma de *T. cruzi* é caracterizado por apresentar variadas seqüências de DNA repetitivo o que torna a PCR ainda mais sensível. Um dos alvos é um fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto (S35/36), que está presente em 80000 a 100000 cópias no parasito (Degraeve et al, 1998). Uma outra seqüência repetitiva corresponde a um fragmento de 188 pb localizado em região de microssatélite, localizado no DNA genômico do parasito amplificado pelos iniciadores TCZ1/2, descrito por Moser et al (1989) e está presente também em 80000 cópias.

Considerando os métodos de microscopia direta para detecção de casos de doença de Chagas aguda, a PCR demonstrou maior sensibilidade e maior precocidade na detecção do parasito (Wincker et al, 1994a; 1997; Russomano et al, 1998).

Em estudo experimental, Kirchhoff et al (1996) demonstraram em 248 amostras coletadas de 8 camundongos, que a PCR, para região de microssatélite, foi 3,9 dias mais precoce na detecção de casos agudos do que a microscopia direta e em 84 coletas com PCR positiva, não foram observados parasitos por exame direto.

Wincker et al (1994a) avaliaram amostras de 45 crianças entre 5 e 8 anos, das 28 amostras com sorologia positiva, 93% apresentaram PCR para seqüência do

cinetoplasto positiva, 14% foram positivas no exame direto de creme leucocitário e uma amostra negativa por sorologia e positiva por exame direto também apresentou PCR positiva. Em um outro estudo realizado pelos mesmos autores em 1997, um maior número de pacientes foi selecionado, 268 escolares com idade entre 1 e 15 anos. Cento e treze crianças tiveram diagnóstico de doença de Chagas confirmado, por microscopia direta do creme leucocitário ou provas sorológicas para IgM e IgG. Destas 93,8% apresentaram PCR positiva, resultado similar ao relato anterior (1994). Entre as 155 crianças negativas, 1 amostra por PCR foi positiva, podendo indicar um resultado falso positivo, ou a infecção pode ser tão recente que não foi detectada de outra forma, ou então o paciente podia estar apresentando algum tipo de imunossupressão.

Russomano et al (1998) avaliaram 1862 amostras de gestantes por sorologia e detectaram por provas sorológicas 9,2% de positividade para doença de Chagas. Entre os recém nascidos, *T. cruzi* foi detectado pela técnica de PCR em 6 no momento do nascimento, destes 2 apresentaram exame direto positivo no mesmo momento, os outros quatro foram positivos por exame direto após 3, 5, 8 e 22 meses após o nascimento, todos com sorologia para IgM negativa. A PCR demonstrou ser uma técnica de diagnóstico mais vantajosa, por sua precocidade, que as técnicas convencionais (detecção de IgM e microscopia direta) para diagnóstico de doença de Chagas em crianças recém-nascidas congênicas.

Comparativamente aos métodos parasitológicos indiretos convencionais (xenodiagnóstico e hemocultura), a PCR qualitativa demonstra maior sensibilidade em pacientes com doença crônica, variando de 45 a 100%.

Ávila et al (1993) em um estudo com 95 amostras de sangue de pacientes moradores de Virgem da Lapa (MG) com doença de Chagas, relataram uma positividade de 54% do xenodiagnóstico realizado em 83 amostras, em relação à PCR, com os iniciadores S35/S36 e posterior hibridização, a positividade foi 100%, todas as amostras positivas por testes sorológicos (91) foram positivas por PCR.

Em uma outra localidade, no Sertão da Paraíba, positividade da PCR foi um pouco menor, 45% em 47 amostras coletadas de pacientes com doença crônica comprovada por provas sorológicas (Britto et al,1995). Nesta mesma região, Borges-Pereira e Coura (1987), demonstraram em estudo anterior, baixa positividade do exame de xenodiagnóstico 13%. Estes estudos revelaram que a detecção de *T. cruzi* pode estar relacionada à área geográfica do estudo, sendo uma área endêmica, ainda com transmissão vetorial, a detecção do parasito é maior.

Junqueira et al (1996) compararam as técnicas de PCR (iniciadores para região do cinetoplasto), xenodiagnóstico e hemocultura ao estudarem 101 amostras de pacientes residentes no Sertão do Piauí com provas sorológicas positivas para doença de Chagas. Este estudo revelou maior detecção do parasito pela prova de PCR (59,4%) em relação ao xenodiagnóstico (35,6%) e a hemocultura (25,7%).

Em um estudo de diagnóstico de doença de Chagas em pacientes com doença crônica, Gomes et al (1999) compararam técnicas parasitológicas, moleculares e sorológicas revelando 83,5% de positividade por PCR e 36,5% por hemocultura em 79 amostras de pacientes com sorologia positiva, 46,2 % dos 13 pacientes com sorologia inconclusiva foram positivas por PCR, e 47,6% de 20 indivíduos com sorologia negativa apresentaram PCR positivo. Este último grupo poderia ser constituído de amostras falso positivas, demonstrando uma das desvantagens de se

ter um método tão sensível como a PCR, que exige inúmeras precauções no momento em que são manipuladas as amostras (ponteiras com filtro descartáveis, ambientes separados cada qual com seus equipamentos). Os autores, porém, citam que tomaram esses cuidados e salientam que esses indivíduos viveram em áreas endêmicas sendo que 46 % deles em casas com presença dos triatomíneos.

Mais recentemente Marcon et al (2002) demonstraram, por nested PCR utilizando uma seqüência de DNA de microssatélite, 86% de positividade em 50 amostras de pacientes com doença de Chagas na fase crônica, confirmados por provas sorológicas.

Outra aplicabilidade atribuída por vários pesquisadores à PCR é o monitoramento da parasitemia durante e pós terapia. Nesta situação os testes sorológicos não são os melhores marcadores, visto persistirem positivos por vários anos após tratamento, neste caso é importante a detecção do parasito seja por métodos parasitológicos indiretos ou por PCR como demonstrado abaixo. A PCR demonstrou uma positividade entre 0 e 69% e o xenodiagnóstico entre 0 e 39,5%, dependendo do tratamento aplicado e tempo de seguimento

Britto et al (2001) avaliaram 85 amostras de pacientes por xenodiagnóstico e PCR, de 7 a 35 anos pós tratamento, destes, 37 foram tratados na fase aguda e 48 na fase crônica, sendo que 15 pacientes com doença crônica receberam placebo. Estes autores observaram maior positividade apresentada pela PCR comparada ao xenodiagnóstico, no período pós tratamento, tanto nos pacientes de fase aguda (27 e 14% respectivamente) como nos pacientes de fase crônica (35 e 17% respectivamente). Pacientes tratados com placebo apresentaram 53,3% de PCR positiva contra 26,7% do xenodiagnóstico.

Apt et al (2005) avaliaram 109 amostras de pacientes 11 anos pós tratamento com itraconazol ou alopurinol, relatando 39,5% de positividade por xenodiagnóstico, 65,1% por PCR e 67,9% PCR combinado à hibridização, demonstrando ser a PCR mais sensível que o exame de xenodiagnóstico no monitoramento da parasitemia pós terapia.

Fernandes et al (2009) avaliaram a eficácia do tratamento com beznidazol, por provas sorológicas, hemocultura e PCR, 80 amostras de pacientes com doença de Chagas crônica durante três anos, relatando 95% de sorologia positiva, hemocultura negativa logo após tratamento, a PCR foi positiva em 88,3% dos casos.

Apesar dos vários estudos citados demonstrarem ser a PCR mais sensível que os métodos parasitológicos, nos pacientes com doença crônica sem imunodepressão, ainda as provas sorológicas são as que melhor se presta para este tipo de diagnóstico. Em situações de transmissão congênita e de controle de tratamento, a PCR demonstra maior aplicabilidade que a sorologia e apresenta maior sensibilidade que os métodos parasitológicos diretos. Em pacientes com imunodepressão poderia vir a ser igualmente útil, principalmente no monitoramento da parasitemia e no diagnóstico precoce da reativação da doença de Chagas.

Schijman et al (2000) avaliaram a utilidade da PCR para o diagnóstico precoce da reativação da doença de Chagas em um paciente submetido a transplante cardíaco e observaram positividade por PCR, tanto no sangue como na biópsia cardíaca, desde o 35º dia pós transplante até o dia da reativação, 73º dia pós transplante, quando foi iniciado tratamento com beznidazol. No 10º dia de tratamento (83º pós transplante), o sangue ainda apresentava positividade por PCR e o exame direto era negativo, a paciente faleceu 89 dias após o transplante.

Diez et al (2007), aplicando a técnica de PCR em pacientes submetidos a transplante cardíaco, sugerem que a parasitemia persistente observada por PCR do kDNA, seguida por duas PCRs positivas para uma seqüência repetitiva do DNA genômico (mini-exon, presente em menor número de cópias no parasito), estaria associada à reativação da doença de Chagas. Estes resultados, porém, foram definidos em PCR qualitativo o qual fornece resultados positivos ou negativos, não sendo um método preciso para medir a parasitemia, importante parâmetro a ser estabelecido na reativação. Dessa forma, outras técnicas moleculares, tais como a PCR competitiva e a PCR em tempo real (RT-PCR) poderiam ser empregadas.

A quantificação de *T. cruzi* por PCR competitiva foi proposta por Centurion-Lara et al em 1994 que utilizaram um fragmento de 280 pb como competidor, resultante da digestão com enzima de restrição de uma seqüência de 330 pb do kDNA.

Lauria-Pires et al (2000) avaliaram amostras de 91 pacientes com doença de Chagas após 10 anos do tratamento de 45 destes pacientes, observando persistência da positividade das provas sorológicas tanto no grupo submetido a tratamento como nos 46 pacientes não tratados. A PCR competitiva revelou média de parasitemia entre os pacientes tratados de $13,8 \pm 14,9$ *T.cruzi*/mL (N=23) e entre os não tratados $20,1 \pm 22,6$ *T.cruzi*/mL (N=27).

Esta técnica também foi utilizada por Schijman et al (2003) em 13 amostras, 7 coletadas de pacientes com menos de seis meses de vida e 6 de pacientes com mais de seis meses, observando maior parasitemia nas crianças mais novas, variando entre 12,5 a 125000 parasitos genoma equivalentes/mL; em crianças com idade acima de 6 meses a parasitemia variou entre 12,5 e 125 parasitos genoma equivalentes/mL. A

evolução do nível de parasitemia foi demonstrada por PCR competitiva no paciente que apresentou 125000 parasitos, sendo observados no 30º dia de tratamento com nifurtimox 12,5 parasitos genoma equivalentes/mL. Burgos et al (2005) demonstraram a utilidade da técnica de PCR no diagnóstico de encefalite chagásica em um paciente infectado por *T. cruzi* e HIV, com base na detecção de DNA de *T. cruzi* em uma biópsia de cérebro. O tratamento foi monitorado por PCR competitiva no sangue periférico que demonstrou inicialmente 2,4 log parasitos genoma equivalente/mL diminuindo aos 25 dias para 1,4 log parasitos genoma equivalente/mL e aos 60 dias para 1,09 log parasito genoma equivalente/mL.

Cummings e Tarleton (2003) descreveram a utilização da PCR em tempo real com SYBR green na quantificação do parasito em diferentes tecidos de camundongos infectados, comparando a sensibilidade da técnica em dois alvos seqüência do cinetoplasto ou de microssatélite. Estes autores demonstraram maior sensibilidade na detecção de seqüências de DNA de microssatélite 0,01 *T. cruzi* comparado a seqüência de cinetoplasto 0,1 *T. cruzi*.

A utilidade da técnica de PCR em tempo real passou a ser estudada em pacientes com doença de Chagas crônica, pacientes com doença congênita e na detecção de reativação em pacientes submetidos a transplante, além do monitoramento da parasitemia durante a terapêutica específica.

Piron et al (2007) observaram 41% e 100% de positividade e especificidade, respectivamente, por PCR-TR ao analisarem amostras de 38 pacientes não tratados com doença de Chagas crônica, 100 indivíduos aparentemente saudáveis de áreas endêmicas, 24 indivíduos aparentemente saudáveis de área não endêmica e 20 pacientes com leishmaniose visceral. Ao compararem Nested PCR e PCR em tempo

real observaram concordância de 90% entre as técnicas. A baixa positividade poderia decorrer da baixa parasitemia ou de sua ausência em adultos vivendo em área não endêmica. Os autores sugerem melhor avaliação do potencial da PCR em tempo real em outras situações: infecção congênita, monitoramento da parasitemia durante a terapêutica, detecção de parasitemia em situações de imunodepressão.

Virreira et al (2007) compararam os níveis de DNA de *T. cruzi* em amostras de sangue de mães e neonatos, através da PCR em tempo real utilizando o sistema SYBR Green com iniciadores específicos para DNA do cinetoplasto, S35/36. Os autores demonstraram uma variação entre 6 e 55600, sendo menor parasitemia nas mães do que em neonatos: 90% das mães com <10 parasitos/ml de sangue e 76% dos neonatos com mais de 1000 parasitos/ml de sangue.

Duffy et al (2009), avaliaram a parasitemia de 38 pacientes pediátricos por PCR em tempo real demonstrando que a variação de 0,01 a 640 parasitos/mL demonstrando correlação negativa com a idade do pacientes (Spearman = - 0,5832, $P < 0,05$), destes, 31 pacientes foram monitorados por PCR em tempo real durante a terapia, dois pacientes ainda apresentavam parasitemia no 60º dia, em um deles variando de 8,28 a 1,16 parasitos/mL e 512 a 0,75 parasitos/mL em outro. Este último apresentou parasitemia persistente por PCR demonstrando falha terapêutica. Três pacientes com doença de Chagas crônica submetidos a transplante cardíaco também foram avaliados e no momento de reativação, comprovada pelo teste de Strout, a parasitemia variou entre 9,07 a 468 parasitos /mL de sangue.

Conforme registros prévios, a reativação da doença de Chagas em pacientes infectados por *T. cruzi* e HIV, ocorre em aproximadamente 20% desses pacientes (Sartori et al, 2007). Estudos prospectivos envolvendo pacientes com co-infecção

HIV/*T cruzi* demonstraram que, ao lado de formas graves, quadros oligossintomáticos podem ser detectados por monitoramento da parasitemia no sangue periférico por QBC (Quantitative Buffy Coat) (Freilij et al, 1983; Amato-Neto et al, 1998). Nesses casos, sucesso na terapia tem sido alcançado (Sartori et al 2002b; Sartori et al 2007).

Os métodos microscópicos diretos, Strout, QBC, microhematócrito ou mesmo histopatológico, expressam alta parasitemia, em um momento tardio de diagnóstico. São descritos também métodos parasitológicos indiretos que também apresentam positividade em pacientes com doença crônica e tendo-se aplicado modificações ao xenodiagnóstico, para quantificação da parasitemia com contagem individual de ninfas, pode-se demonstrar uma diferença em relação à parasitemia entre indivíduos com co-infecção com e sem reativação. No entanto, deve-se ter em conta, que é um método mais trabalhoso, exige manipulação de parasitos vivos, necessitando de infraestrutura para manutenção dos parasitos, além de demandar grande tempo para o seu processamento, pelo menos um mês.

Tendo em vista a importância do monitoramento dos níveis de parasitemia nesses casos, a aplicação de métodos moleculares quantitativos como a PCR competitiva ou a PCR em tempo real permitiriam obter resultados mais precisos, num período menor e possivelmente mais precocemente como já demonstrado nos vários relatos já citados (Centurion-Lara et al, 1994; Schijman et al, 2003; Burgos et al, 2005; Piron et al, 2007; Virreira et al, 2007; Duffy et al, 2009)

Dessa forma, considerando a morbidade e mortalidade da reativação da doença de Chagas crônica, propomos neste projeto a utilização de um método sensível e mais precoce na avaliação da parasitemia em pacientes com co-infecção

HIV/*T. cruzi* que possa vir a ser útil na decisão do médico em relação a introdução ou não de terapia pré-emptiva para Doença de Chagas.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

2.1.1. Estudar o papel da PCR em tempo real para avaliar o nível de parasitemia em grupos de pacientes com doença de Chagas crônica e pacientes co-infecção HIV/*T. cruzi* com e sem reativação da doença de Chagas;

2.1.2. Comparar o nível de parasitemia observado por métodos moleculares de diagnóstico qualitativos e quantitativos (PCR) e métodos parasitológicos (Xenodiagnóstico e Hemocultura).

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Comparar os níveis de parasitemia observados por PCR competitiva com a PCR em tempo real;

2.2.2. Comparar os níveis de parasitemia observados em três grupos de pacientes: com doença de Chagas crônica, com co-infecção HIV/*T. cruzi* sem reativação da doença de Chagas e com co-infecção HIV/*T. cruzi* e reativação da doença de Chagas;

2.2.3. Comparar o nível de parasitemia com a carga viral em pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi*;

2.2.4. Comparar o nível de parasitemia com níveis de CD4/mm³, CD8/mm³ e razão CD4/CD8.

MÉTODOS

3. Métodos

3.1. Casuística

Foram analisadas amostras de 91 pacientes provenientes do Ambulatórios e Enfermarias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e 58 indivíduos controles aparentemente saudáveis. O protocolo de Pesquisa: “Caracterização Molecular de *Trypanosoma cruzi* isolados de pacientes com Doença de Chagas e co-infecção HIV-*T. cruzi* – Nível de parasitemia por técnicas parasitológicas e moleculares”, foi aprovado na Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq 231/02).

Os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Pós Informação ou tiveram garantido o sigilo sobre sua identificação, no caso das amostras armazenadas.

3.2. Critérios de inclusão

3.2.1. Grupo crônico (CR)

Este grupo foi constituído por sessenta e quatro pacientes na fase crônica da doença de Chagas, com presença de dois ou três resultados positivos em três provas sorológicas convencionais para a doença de Chagas: imunofluorescência indireta, $\geq 1/40$ (IFI), hemaglutinação indireta, $\geq 1/40$ (HA) e ensaio imunoenzimático (ELISA), realizados na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (Ferreira e Ávila

2001). Todos os pacientes foram provenientes do Ambulatório da Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

3.2.2. Grupo com co-infecção HIV/*T.cruzi* (CO)

Foram incluídos neste grupo vinte e nove pacientes (86 amostras) com diagnóstico de infecção por HIV pela prova de ELISA, seguida de confirmação por Imunoblot (Ferreira e Ávila, 2001) e diagnóstico de Doença de Chagas, realizado similarmente ao do grupo crônico. Todos eram provenientes dos Ambulatórios do Serviço de Extensão e Atendimento ao paciente com infecção por HIV/aids da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias;

3.2.3. Grupo com co-infecção HIV/*T.cruzi* e reativação da doença de Chagas (RE)

Cinco pacientes com doença de Chagas crônica com infecção pelo HIV, apresentaram reativação documentada pela presença de *T. cruzi* em exame direto. Dois pacientes foram incluídos por apresentar reativação confirmada no sangue periférico e três ao exame microscópico direto do líquido. Cinco amostras de sangue foram avaliadas por provas parasitológicas e moleculares, 2 amostras de líquido foram avaliadas por provas moleculares. Todos foram internados nas Enfermarias da Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

3.2.4. Grupo controle: indivíduos aparentemente saudáveis (NL)

Cinquenta e oito indivíduos voluntários, aparentemente saudáveis, foram escolhidos por não terem antecedentes de contacto prévio com triatomíneos e/ou de familiares com doença de Chagas, e por apresentarem provas sorológicas, IFI, HA e/ou TESA-Blotting (Ferreira e Ávila, 2001; Umezawa et al, 1996) negativas para doença de Chagas.

3.3. Coleta de sangue

Foram coletadas as seguintes amostras de sangue da veia cubital:

- 8 a 12 mL de sangue em tubo estéril com EDTA para os ensaios de PCR, a 8 mL foi adicionado igual volume de tampão contendo Guanidina Hidroclorato 6 M e EDTA 0,2 M e/ou 4 a 8 mL foram processados em plasma, creme leucocitário com e sem hemácias e sangue total;
- 30 mL de sangue em tubo estéril com heparina sódica (Roche) para a hemocultura;
- 10 mL de sangue em tubo estéril com heparina sódica (Roche) para o xenodiagnóstico;
- 3 a 5 mL de líquido, metade do volume para ensaios moleculares e o restante para cultura (2 pacientes com reativação no sistema nervoso central).

3.4. Provas Parasitológicas

3.4.1. Hemocultura (HC)

As hemoculturas foram realizadas com 90 amostras de pacientes no Laboratório de Investigação Médica em Parasitologia do HC - FMUSP- LIM 46, conforme descrição prévia de Chiari et al, 1966 e modificação de Luz et al, 1994: 30 mL de sangue foram centrifugados, o plasma foi removido, o sedimento contendo hemácias foi lavado uma vez em meio LIT (Liver Infusion Triptone), ressuspensão em 10 mL do mesmo meio e distribuído em 6 tubos contendo 2 mL de LIT em cada.

A leitura desses tubos para pesquisa de parasitos foi realizada no 15°, 30°, 60° e 90° e 120° dias a partir da semeadura.

Para critérios de quantificação, foi considerado no ensaio de hemocultura o número de tubos positivos em relação ao número de tubos examinados, após a finalização das leituras. Foram considerados como positivos quaisquer exames com pelo menos um tubo positivo

3.4.2. Xenodiagnóstico (XD)

Esta prova foi aplicada a 88 amostras de pacientes e foi realizada na Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz – SP, e, no Laboratório de Investigação Médica em Parasitologia do HC - FMUSP- LIM 46.

Foram utilizadas de 20 a 40 ninfas de *Triatoma infestans* (3º e 4º estágio) alimentadas (in vitro), em 10 mL de sangue do paciente. A pesquisa de *T. cruzi* no conteúdo digestivo dos insetos foi realizada no 30º e 60º dia da coleta.

A leitura das ninfas foi individual, e para fins de quantificação foram consideradas o percentual de ninfas positivas observadas em relação ao total de ninfas vivas examinadas. Foram considerados como positivos quaisquer exames com pelo menos uma ninfa positiva.

Vale salientar que todas as 91 amostras foram testadas por pelo menos uma prova parasitológica indireta (PI - hemocultura e/ou xenodiagnóstico).

3.4.3. Exame microscópico direto (MD)

Foram realizados por duas provas exame microscópico do creme leucocitário: (Luquetti e Rassi, 2000) e pelo “Quantitative Buffy Coat” (QBC) (Freilij et al, 1983; Amato-Neto et al, 1998). Noventa amostras foram testadas.

3.5. Provas moleculares

3.5.1. Extração de DNA

Duas técnicas foram aplicadas para extração de DNA:

3.5.1.1. Extração em Tampão Guanidina HCl/EDTA para sangue periférico

Foram coletados 10 mL de sangue total em 10 mL de Guanidina-HCl-EDTA pH 8,0 (Ávila et al, 1991). A extração foi realizada segundo Wincker et al (1994) com algumas modificações: a 500 µL da amostra, foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, a fase superior foi recuperada repetindo-se o procedimento. Após uma última etapa de purificação com clorofórmio/álcool isoamílico seguiu-se a precipitação com etanol absoluto e acetato de sódio 3M. O DNA foi ressuspeso em 50 µL de H₂O bidestilada.

3.5.1.2. Extração por QIAamp[®] DNA Mini para creme leucocitário com e sem hemácias e líquido.

Foram extraídos 200 µL de creme leucocitário e ou líquido através do sistema QIAamp[®] DNA Mini (Quiagen) conforme instruções descritas no manual do fabricante.

Salienta-se que as extrações das amostras biológicas dos pacientes foram realizadas uma a uma em dias distintos, sendo cada uma pareada a uma amostra de controle saudável.

3.5.1.3. Quantificação do DNA total extraído

A quantidade de DNA e sua pureza foram analisadas por espectrofotometria (GeneQuant RNA/DNA calculator – Pharmacia Biotech).

3.5.2. PCR Qualitativo

Foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores designados S35 e S36 (Degrave et al, 1988), que amplifica um fragmento de 330 pares de base do cinetoplasto, sintetizados pela Gibco Life Technologies. A PCR foi realizada segundo Ávila et al (1991) e Gomes et al (1998), com algumas modificações: 0,4 pM de cada iniciador, 0,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1 X concentrado, 0,2 mM de MgCl₂ (Taq Platinum® - Invitrogen Corporation) um volume final de 25 µL. Segue a seqüência dos iniciadores:

S35 – 5' – AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT GA – 3'

S36 – 5' – GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA – 3'

A reação foi feita em duplicata e como controle para verificar a presença de inibidores na amostra de DNA extraída em uma das réplicas foram acrescentados 2 fg de

DNA de *T. cruzi* cepa Y, o resultado da reação foi considerado ao se observar amplificação do produto específico no teste de inibição.

Salienta-se, em todas as reações, o emprego de dois controles: um controle da sala de preparo de reagentes e um controle da sala de aplicação do DNA, além disso, todas as reações foram realizadas em ambientes separados, isto é, uma sala para preparo dos reagentes, uma para extração e aplicação das amostras de DNA e a outra para a detecção dos produtos amplificados.

3.5.3. PCR Quantitativa Competitiva

3.5.3.1. Obtenção do DNA Competidor

O fragmento de DNA denominado competidor, inserido no plasmídio pT 7 Blue foi cedido gentilmente pelo Prof. Antônio R.L. Teixeira do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, da Universidade de Brasília.

A transformação de bactérias *E. coli* competentes (DH10B) foi realizada por choque térmico: Foram adicionados 2 µg do DNA do plasmídio a 100 µL das bactérias, a amostra foi incubada a 42° C por 3 minutos e a seguir submetida a temperatura de 0o C por 3 minutos, adicionando-se imediatamente após, 1 ml de meio SOC (Tripton, Extrato de Levedura, NaCl, Glicose e MgCl₂) líquido. A amostra foi incubada a 37° C em agitação por 2 horas e plaqueada em meio seletivo (com ampicilina) a 37° C por 12 horas. As colônias com o plasmídio foram inoculadas em 3,5 mL de meio LB líquido mais ampicilina.

Após incubação das bactérias por 12 horas, a amostra foi centrifugada o sobrenadante descartado e ao precipitado foi adicionado tampão P1 (50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA pH8). Após homogeneizar, ao material foi acrescentado tampão P2 (200 mM NaOH, 1% de SDS) incubando por 5 minutos a temperatura ambiente, por fim foi adicionado o tampão P3 (3 M KOAc pH 5,5), agitou-se levemente, pós centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e o DNA precipitado com isopropanol. O precipitado foi ressuspensionado em 50 µL de água deionizada.

O DNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro GeneQuant RNA/DNA calculator – Pharmacia Biotech. Foram feitas três dosagens de cada amostra.

3.5.3.2. PCR Competitiva

Foi realizada segundo a padronização de Centurion e Lara et al (1994).

Foram utilizadas quatro diluições (150 fg, 15 fg, 1,5 fg e 0,15 fg) do competidor acrescentadas a quatro alíquotas de DNA do paciente previamente testadas e apresentando resultado positivo ao exame qualitativo de PCR S35/S36. Considerou-se um parasito equivalendo a 15 fg de DNA. As condições utilizadas para realização da PCR foram as mesmas descritas no ensaio de PCR qualitativo. Foram empregados para cada reação dois controles negativos.

O ponto de equivalência foi obtido visualmente, comparando-se a intensidade dos produtos de 280 e 330 pb. Para o cálculo do número de *T. cruzi*/mL de sangue foram considerados, além do ponto de equivalência, a quantidade de DNA em µL do paciente aplicado na reação de PCR, diluição e quantidade de sangue extraído.

3.5.4. PCR em tempo real

Foram utilizados os iniciadores que amplificam o produto de 149 pb do DNA nuclear TCZ3/TCZ4 descritos por Ochs et al (1996) com o sistema Sybr Green Advantage qPCR Premix (Clontech), segundo recomendações do fabricante no aparelho Rotor Gene RG-300 (Corbett Research).

Para obtenção da curva padrão foram feitas diluições seriadas de DNA de 10^5 a 10^{-2} *T. cruzi*/μL.

3.5.5. Visualização do produto amplificado

Os produtos obtidos após amplificação por PCR S35/S36 e TCZ3/TCZ4 foram revelados em gel de agarose a 2% e 3 % respectivamente, corado com brometo de etídeo e documentados pelo sistema Eagle Eye (Stratagene).

3.6. Distribuição das amostras segundo os grupos estudados e exames realizados

Na **Tabela 1**, observa-se a distribuição das amostras segundo os grupos de pacientes estudados e as provas parasitológicas e moleculares realizadas.

Tabela 1. Distribuição das amostras coletadas de 91 pacientes e 58 indivíduos saudáveis segundo os grupos, as provas de hemocultura (HC), xenodiagnóstico (XD), parasitológico indireto (PI), microscopia direta (MD), PCR qualitativa S35/36, PCR competitiva (PCR-C) e PCR em tempo real (PCR-TR).

Grupos (N)	Provas Parasitológicas				Provas Moleculares			
	HC	XD	PI	MD	PCR S35/36	PCR-C	PCR-TR	
CR: D. Chagas Crônica (57)	57	54	57	57	57	17	29	
CO: Co-infecção HIV/ <i>T. cruzi</i> (29)	28	29	29	28	29	16	26	
RE: Co-infecção HIV/ <i>T. cruzi</i> + reativação (5)	5	5	5	5	5	5	5	
NL: Controle sem doença (58)	nr*	nr*	nr*	nr*	58	nr	36	
Total	90	88	91	90	149	38	96	

nr: não realizada

3.7. Análise estatística

O programa SPSS versão 17.0 foi utilizado para as análises.

3.7.1. Comparação dos testes usados para diagnóstico

Para as comparações entre os testes de xenodiagnóstico, hemocultura, PCR S35/S36, PCR competitiva e PCR em tempo real em relação às diferenças de sensibilidade dos testes (resultados qualitativos), considerou-se haver dependência entre as amostras e foi aplicado o teste de McNemar.

No teste de McNemar os dados são organizados em tabelas 2X2 quanto à concordância e a discordância dentro do par. Neste teste os dados de discordância são considerados para análise.

3.7.2. Correlação entre os ensaios quantitativos

Antes de se estabelecer a análise de correlação entre os dados quantitativos, as variáveis xenodiagnóstico (% de tubos positivos), hemocultura (% de tubos positivos) PCR competitiva e PCR em tempo real (*T. cruzi*/mL de sangue), células T CD4 +/mm³ e CD8+/mm³ e carga viral foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para análise de correlação aplicou-se o teste não paramétrico de Coeficiente de Correlação de Spearman.

3.7.3. Comparação dos dados qualitativos entre os grupos de pacientes

A comparação da frequência de positividade entre os grupos de pacientes, nos ensaios de PCR qualitativa, xenodiagnóstico, hemocultura e exames parasitológicos indiretos (xenodiagnóstico e hemocultura) foi realizada através do teste de qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher dependendo dos valores dos dados nas tabelas de contingência.

A comparação foi realizada entre os pacientes com doença de Chagas crônica e pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi*.

3.7.4. Comparação dos dados quantitativos entre os grupos de pacientes

Para análise de dados foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal Wallis para comparar os três grupos e para comparação dos dados dois a dois, aplicou-se o teste de Mann Whitney.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Padronização dos ensaios moleculares

4.1.1. PCR qualitativa S35/36

O limite de detecção observado na PCR qualitativa com os iniciadores S35/36 foi 2×10^{-16} $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ de DNA correspondente a 0,01 *T. cruzi* (**Figura 1**).

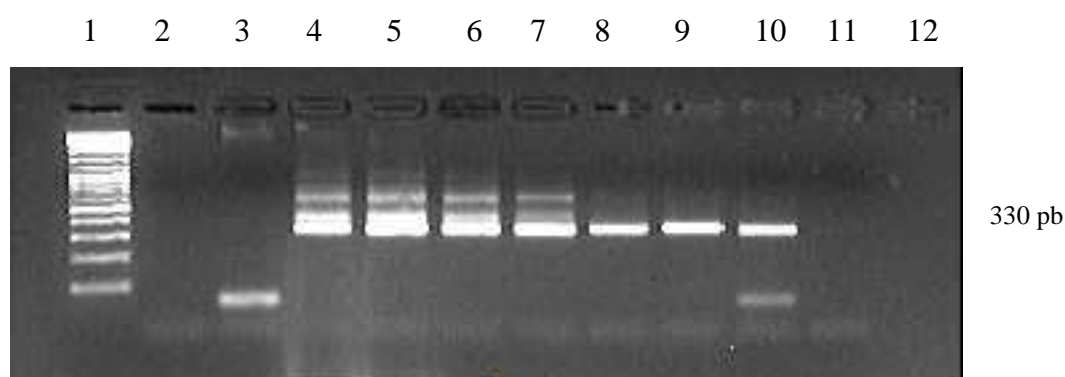


Figura 1 - Ensaio de PCR analítico, utilizando diluições seriadas de DNA de epimastigota extraído de cepa Y, considerando a massa de DNA. Amostras: 1) Padrão de Peso Molecular gene Ruler tm 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2) Controle negativo da sala de mistura reativa; 3) Controle negativo da sala de aplicação de DNA. 4) 2×10^{-13} ; 5) 5×10^{-14} ; 6) 2×10^{-14} ; 7) 5×10^{-15} ; 8) 2×10^{-15} ; 9) 5×10^{-16} ; 10) 2×10^{-16} ; 11) 5×10^{-17}

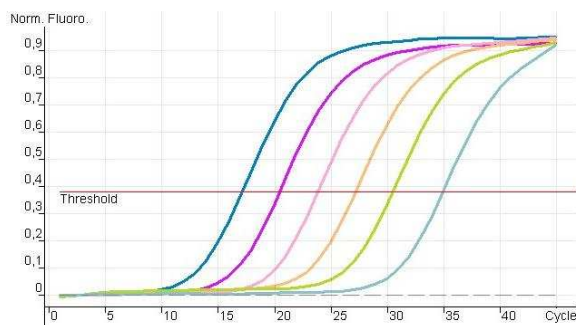
4.1.2. PCR em tempo real TCZ3/4

Observam-se na **Figura 2**, dados referentes à padronização da PCR em tempo real para quantificação de *T. cruzi* utilizando os iniciadores TCZ3/4. Nas curvas de quantificação (**Figura 2A**) obtidas por diluição seriada dos parasitos (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0), a linha (Threshold) intercepta a curva na escala Log de amplificação (0,380 de fluorescência). A partir da curva de quantificação, tem-se a curva padrão, destacada na **Figura 2B**, com eficiência de 0,93 e valor de correlação linear (r^2) = 0,996. Na **Figura 2C**, observa-se a superposição das curvas de dissociação em um único pico de $88,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$. O limite de detecção de parasitemia observado foi de 0,1 parasito/ μL de DNA aplicado na PCR. Para a confecção da curva considerou-se até 1 parasito.

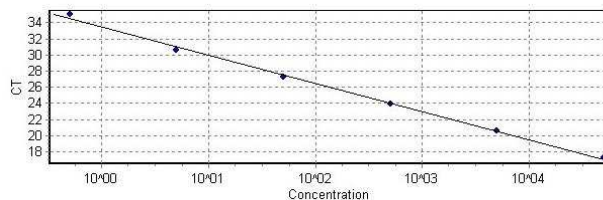
Nas amostras de pacientes, a especificidade foi controlada por dois parâmetros: 1) Aceitou-se a temperatura de dissociação, com média igual a $88,9 \pm 0,8^\circ\text{C}$, variando de $86,5$ a $89,8^\circ\text{C}$;

2) Visualização do produto esperado de 144 pb em gel de agarose a 3%.

A



B



C

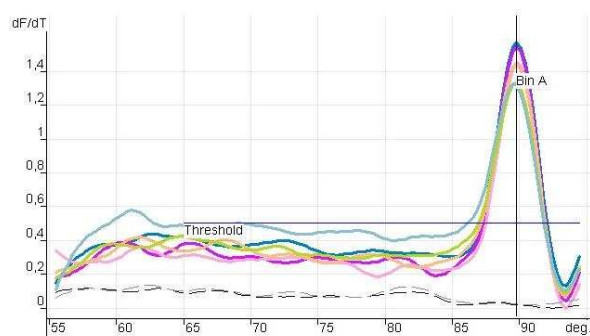


Figura 2 - Padronização da PCR em tempo real: **A.** Diluições seriadas de DNA de *T. cruzi* de 10^5 até 1 parasito/ μ L de DNA, threshold = 0,380 de fluorescência. **B.** Gráfico demonstrando a temperatura de melting de $88,6 \pm 0,3^\circ$ C. Curva Padrão entre concentração de parasito e “CT” (cycle threshold), valor da correlação $r^2 = 0,996$.

4.2 – Dados demográficos: Idade e gênero

As características relacionadas a gênero e idade dos pacientes dos grupos CR, CO e RE estão representadas na **Tabela 2**. Apesar do predomínio de indivíduos do gênero feminino (61,4%) no grupo crônico (CR) e masculino (66,7%) no grupo reativado (RE) não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nessa distribuição (teste de Qui-quadrado $P = 0,182$). Em relação à idade, foram observadas diferenças entre os grupos CR x RE, $P = 0,014$.

Tabela 2 - Distribuição de 91 amostras coletadas de pacientes nos grupos crônico (CR), co-infectado (CO) e reativado (RE) de acordo com gênero (%) e idade: média (desvio padrão DP), valor máximo e mínimo e mediana.

Parâmetros		CR N = 57	CO N = 29	RE N = 6
Gênero (%)	Masculino	38,6	48,3	66,7
	Feminino	61,4	51,7	33,3
Idade (anos)	Média (DP)	46,1 (12,2)	42,0 (10,1)	32,7 (3,93)
	Mínimo	17	26	28
	Máximo	70	68	39
	Mediana	43	38	33

4.3. Resultados qualitativos: testes parasitológicos e PCR S35/36

Na análise dos resultados, foram comparados os resultados dos exames parasitológicos e moleculares independentemente dos grupos estudados.

Entre as 71 amostras que apresentavam pelo menos uma prova parasitológica indireta positiva (xenodiagnóstico ou hemocultura), todas foram positivas pelo teste de PCR. Não foi observada amplificação de DNA de *T. cruzi* nas 58 amostras coletadas dos indivíduos controles, sem doença de Chagas. Em relação ao teste de inibição, todas as amostras, incluindo pacientes negativos e indivíduos controle, apresentaram amplificação do produto de 330pb, seqüência de DNA de *T. cruzi*.

Observa-se a **Tabela 3**, a baixa sensibilidade da prova parasitológica direta, 2 pacientes apresentaram reativação da doença de Chagas no sangue observada por QBC, Entre os exames parasitológicos indiretos, a hemocultura apresentou maior positividade que o xenodiagnóstico, e, mesmo considerando os resultados desses dois exames (parasitológico indireto), a reação de PCR qualitativa demonstrou maior positividade em relação a todos eles.

Tabela 3 - Positividade (%) de 91 amostras de sangue avaliadas por PCR S35/36, xenodiagnóstico (XD), hemocultura (HD), xenodiagnóstico ou hemocultura (PI) e exame microscópico direto (MD).

	PCR S35/36	XD	HC	PI	MD
Positividade %	65,9	24,4	35,6	44,0	2,2
Total (N)	(91)	(86)	(90)	(91)	(90)

Todas as amostras positivas pelos testes parasitológicos (xenodiagnóstico e hemocultura) foram positivas também por PCR S35/36.

A análise dos resultados discordantes pelo teste de McNemar (**Tabela 4**) revelou que a hemocultura foi ligeiramente mais sensível que xenodiagnóstico, porém, sem significância estatística; em relação à PCR qualitativa S35/S36, esta apresentou-se mais sensível do que o xenodiagnóstico, a hemocultura e também em relação a dos um testes parasitológicos, xenodiagnóstico e/ou hemocultura, ($p < 0,001$).

Tabela 4 – Comparação dos resultados da PCR qualitativa S35/S36, xenodiagnóstico, hemocultura e parasitológico indireto: xenodiagnóstico e/ou hemocultura, pelo teste de McNemar.

		Hemocultura		
		+	-	total
Xenodiagnóstico	+	13	7	20
	-	16	51	67
	total	29	58	87
		<i>P</i> = 0,093		

		PCR S35/36		
		+	-	total
Xenodiagnóstico	+	21	0	21
	-	36	31	67
	total	57	31	88
		<i>P</i> < 0,001		

		PCR S35/36		
		+	-	total
Hemocultura	+	32	0	32
	-	27	31	58
	total	59	31	90
		<i>P</i> < 0,001		

		PCR S35/36		
		+	-	total
Parasitológico Indireto	+	40	0	40
	-	20	31	51
	total	60	31	91
		<i>P</i> < 0,001		

4.4. Ensaios moleculares quantitativos

Para proceder aos ensaios moleculares quantitativos foram selecionados os pacientes que apresentaram PCR qualitativa S35/36 positiva.

4.4.1. PCR competitiva

A PCR competitiva foi realizada em 38 amostras com PCR qualitativa positiva e o número de *T. cruzi*/mL de sangue variou entre 0 e 50000. Cinco pacientes apresentaram intensidade de banda muito fraca, necessitando de quantidades muito grandes de DNA para possibilitar visualização, a intensidade de banda ficou abaixo do limite de detecção 0,15 fg. As **Figuras 3 e 4** exemplificam o ensaio, na primeira tem-se um paciente com doença de Chagas crônica HIV negativo, com 1,5 fg de DNA de *T. cruzi* ou 0,1 *T. cruzi* (ponto de equivalência da coluna 6, **Figura 3**), considerando as diluições, volume de sangue e extração, tem-se que este paciente apresenta 2 *T. cruzi*/mL de sangue. Na **Figura 4**, o ponto de equivalência corresponde a 150 fg ou 10 *T. cruzi*, considerando as diluições do volume total de sangue extraído, este paciente que tem co-infecção apresentou 5000 *T. cruzi*/mL de sangue.

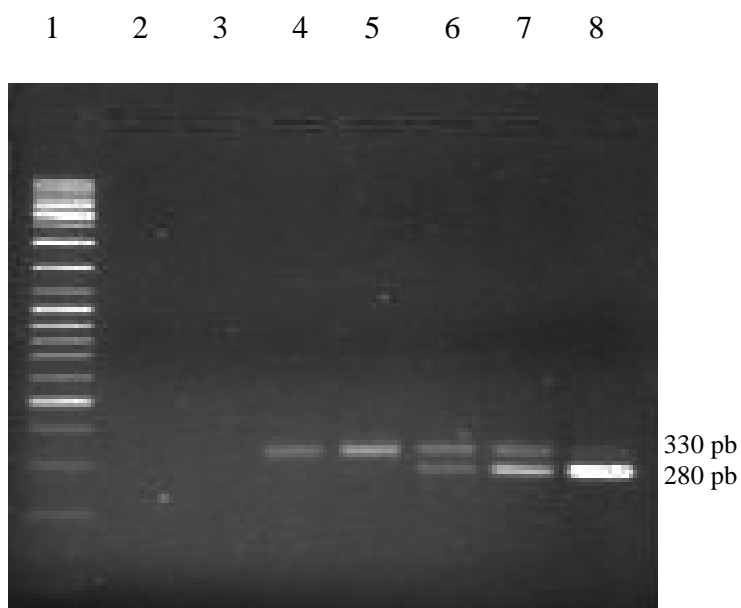


Figura 3 - Ensaio de PCR competitiva em amostra de DNA de um paciente com doença crônica. Amostras: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler tm 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de mistura reativa; 3. Controle negativo da sala de aplicação de DNA. 4. Paciente com doença de Chagas crônica (330 pb); 5 – 8. Paciente (330 pb) com acréscimo de DNA competidor (280 pb): 0,15 fg; 1,5 fg; 15 fg e 150 fg, respectivamente. Amostra 6. Ponto de equivalência.

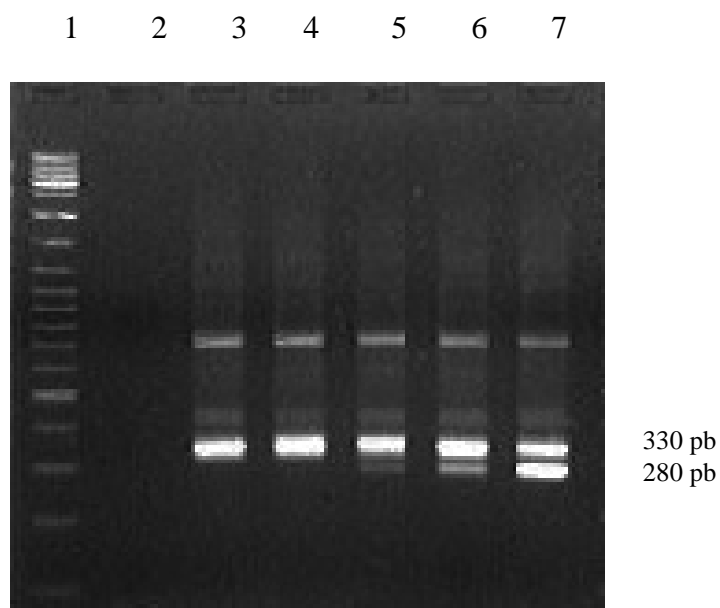


Figura 4 - Ensaio de PCR competitiva em amostra de DNA de um paciente com co-infecção HIV/*T. cruzi*. Amostras: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler tm 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de aplicação de DNA. 3. Paciente com co infecção (330 pb); 4 – 7. Paciente (330 pb) com acréscimo de DNA competidor (280 pb): 0,15 fg; 1,5 fg; 15 fg e 150 fg, respectivamente. Amostra 7. Ponto de equivalência.

4.4.1.1 Comparação entre testes parasitológicos e PCR competitiva

A análise comparativa dos resultados observados em 35 amostras, por PCR competitiva e xenodiagnóstico, revelou 48,6% de concordância. Em relação à análise dos pares discordantes, foi observada maior positividade da prova molecular, sendo a diferença estatisticamente significativa ($P = 0,001$).

Quanto à comparação realizada entre PCR competitiva e hemocultura, em 37 amostras, observou-se 56,7% de concordância, e, apesar da maior positividade da PCR, à análise dos pares discordantes, não houve diferença estatisticamente significativa.

Ao serem considerados os resultados das provas de xenodiagnóstico e/ou hemocultura (parasitológico indireto) e a PCR competitiva, 65,8% dos resultados apresentaram concordância entre si, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as provas (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Análise dos resultados qualitativos da PCR competitiva, xenodiagnóstico, hemocultura e parasitológico indireto: xenodiagnóstico e/ou hemocultura pelo teste de McNemar.

		PCR competitiva		
		+	-	total
Xenodiagnóstico	+	14	1	15
	-	17	3	20
	total	31	4	35
		<i>P</i>	< 0,001	

		PCR competitiva		
		+	-	total
Hemocultura	+	21	5	26
	-	11	0	11
	total	32	5	37
		<i>P</i>	= 0,210	

		PCR competitiva		
		+	-	total
Parasitológico Indireto	+	25	5	30
	-	8	0	8
	total	33	5	38
		<i>P</i>	= 0,581	

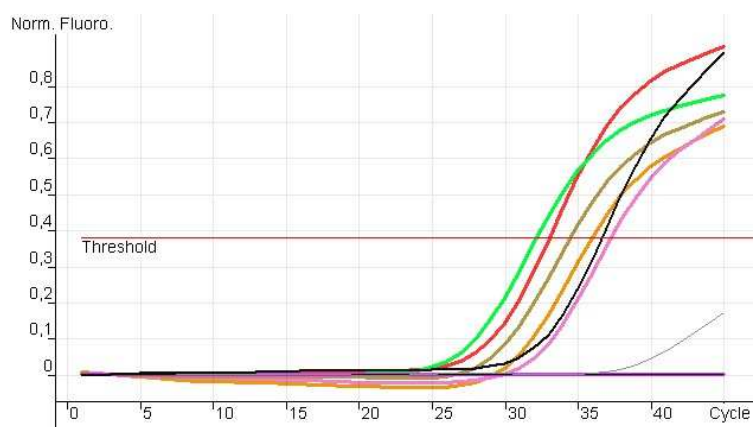
4.4.2. PCR em tempo real

Sessenta amostras de sangue, positivas por PCR qualitativo, foram testadas no ensaio de PCR em tempo real, a parasitemia variou entre 0 (não detectado ou abaixo do limiar estabelecido para quantificação, threshold = 0,38) e 352000 *T. cruzi*/mL de sangue coletado, 49 amostras foram positivas.

A **Figura 5** exemplifica os resultados obtidos com amostras de 6 pacientes e 6 amostras de controles sem a doença utilizadas no ensaio: 5 A e B, curva de quantificação, cujos valores que variam entre 0 a 89,2 *T. cruzi*/mL de sangue, e respectiva curva de dissociação (T_m $89,4 \pm 0,2^\circ$ C) de 6 pacientes com doença de Chagas crônica, 5 apresentaram curva para quantificação e um paciente apresentou resultado negativo;

A **Figura 6** A e B representa a curva de quantificação, correspondendo a 35,4 a 926 *T. cruzi*/mL de sangue, e respectiva curva de dissociação ($T_m = 89,3 \pm 0,3$) de 5 pacientes com co-infecção *T. cruzi*/HIV positivos. Os controles sem a doença podem ser visualizados na curva de dissociação representados por linhas tracejadas, não foi observada amplificação nos controles (linhas cinzas), os controles positivos são representados pelas linhas contínuas na cor preta e na cor cinza.

5A



5B

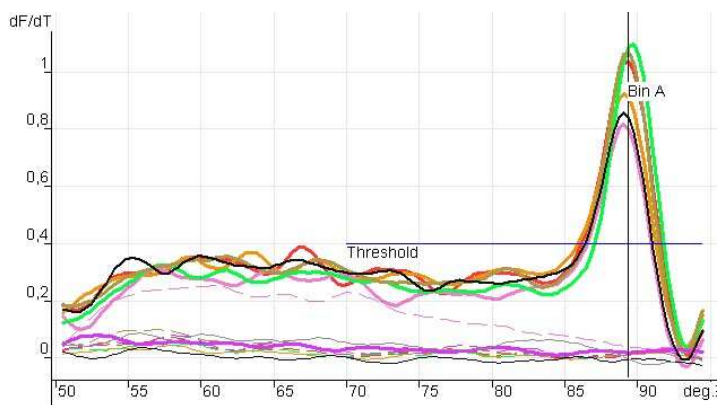
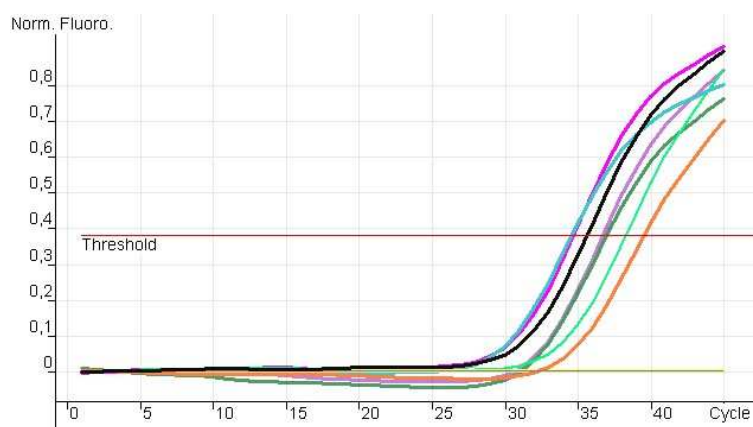


Figura 5 - Curvas de quantificação e da temperatura de dissociação observadas em 6 pacientes com doença de Chagas crônica (**5A e 5B**). As linhas contínuas mais grossas representam os pacientes, exceto a de cor preta que é o controle positivo 5×10^{-14} . As linhas tracejadas representam amostras de controles sem a doença de Chagas e as linhas cinzas mais finas representam dois controles negativos: água aplicada nas salas de preparo dos reagentes e de aplicação do DNA.

6A



6B

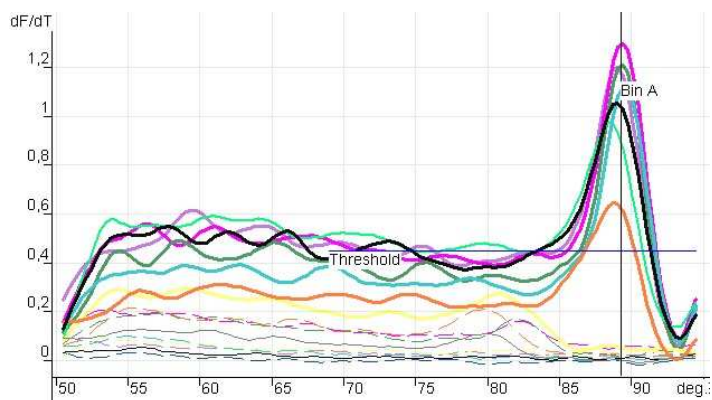


Figura 6 - Curvas de quantificação e da temperatura de dissociação observadas em 5 pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi* (**6A e 6B**). As linhas contínuas mais grossas representam os pacientes, exceto a de cor preta e cinza que representam os controles positivos 5×10^{-14} e 5×10^{-15} respectivamente. As linhas tracejadas representam amostras de controles sem a doença de Chagas e as linhas cinzas mais finas representam dois controles negativos: água aplicada nas salas de preparo dos reagentes e de aplicação do DNA.

4.4.2.1. Comparação qualitativa entre PCR em tempo real, PCR competitiva e os testes parasitológicos

As análises comparativas entre os resultados qualitativos observados PCR em tempo real, PCR competitiva e os testes parasitológicos estão representadas na **Tabela 6**.

Em análise de 38 amostras, não foi observada diferença entre as provas de PCR em tempo real e PCR competitiva.

Considerando os resultados concomitantes observados por PCR em tempo real e xenodiagnóstico em 57 amostras, foi observada 47,4% de concordância, sendo a prova molecular mais sensível, comprovada pela análise dos pares discordantes ($P < 0,001$). Diferença significativa também foi observada em relação a PCR em tempo real e hemocultura. A sensibilidade da prova molecular foi superior à parasitológica ($P = 0,002$), entre elas a concordância foi 59,3% (59 amostras).

Quanto às comparações realizadas entre PCR em tempo real e provas parasitológicas indiretas, observou-se concordância em 68,3% das 60 amostras analisadas, e a PCR mostrou ser mais sensível, porém a análise dos pares discordantes não revelou diferença estatisticamente significativa.

Tabela 6 – Comparação dos resultados qualitativos observados pela PCR em tempo real, PCR competitiva, xenodiagnóstico, hemocultura e parasitológico indireto: xenodiagnóstico e hemocultura pelo teste de McNemar.

		PCR em tempo real		
		+	-	total
PCR competitiva	+	31	2	33
	-	4	1	5
	total	35	3	38
		$P = 0,687$		

		PCR em tempo real		
		+	-	total
Xenodiagnóstico	+	19	2	21
	-	28	8	36
	total	47	10	57
		$P < 0,001$		

		PCR em tempo real		
		+	-	total
Hemocultura	+	28	4	32
	-	20	7	27
	total	48	11	59
		$P = 0,002$		

		PCR em tempo real		
		+	-	total
Parasitológico Indireto	+	35	5	40
	-	14	6	20
	total	49	11	60
		$P = 0,064$		

4.5. Correlação entre os ensaios quantitativos

4.5.1. Hemocultura (% de tubos positivos) versus xenodiagnóstico (% de ninfas positivas)

Conforme observado, a análise de 87 amostras demonstrou uma fraca correlação entre os resultados de hemocultura e xenodiagnóstico (**Figura 7**).

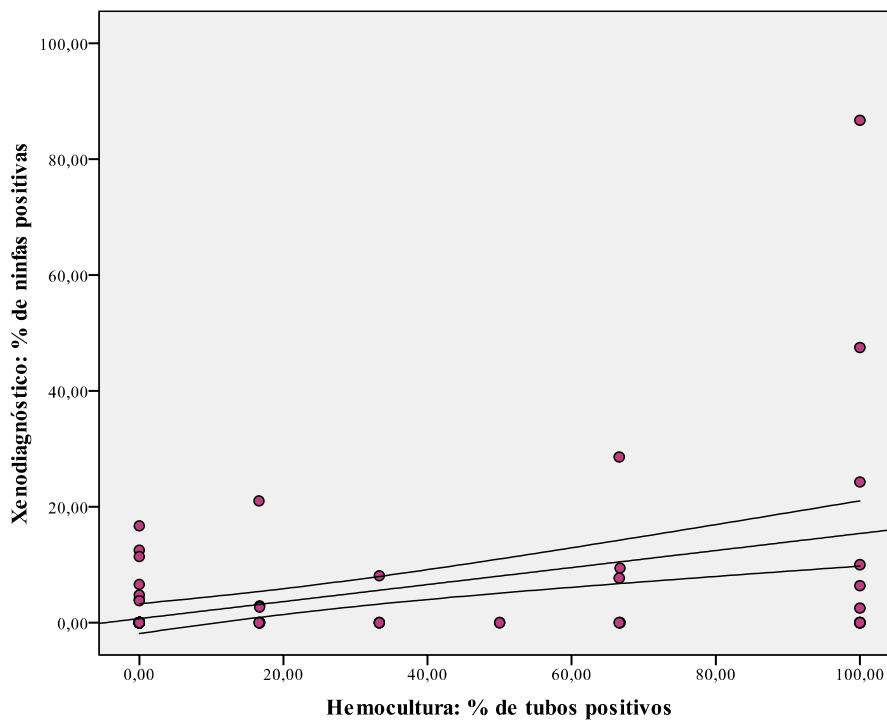


Figura 7 - Correlação entre hemocultura (% de tubos positivos) e xenodiagnóstico (% de ninfas positivas) em 87 amostras. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = 0,398 e $P < 0,001$.

4.5.2. PCR competitiva (*T. cruzi*/mL de sangue) versus xenodiagnóstico quantitativo (% de ninfas positivas)

A análise de 35 amostras demonstrou uma correlação moderada entre os resultados de PCR competitiva e xenodiagnóstico. (Figura 8).

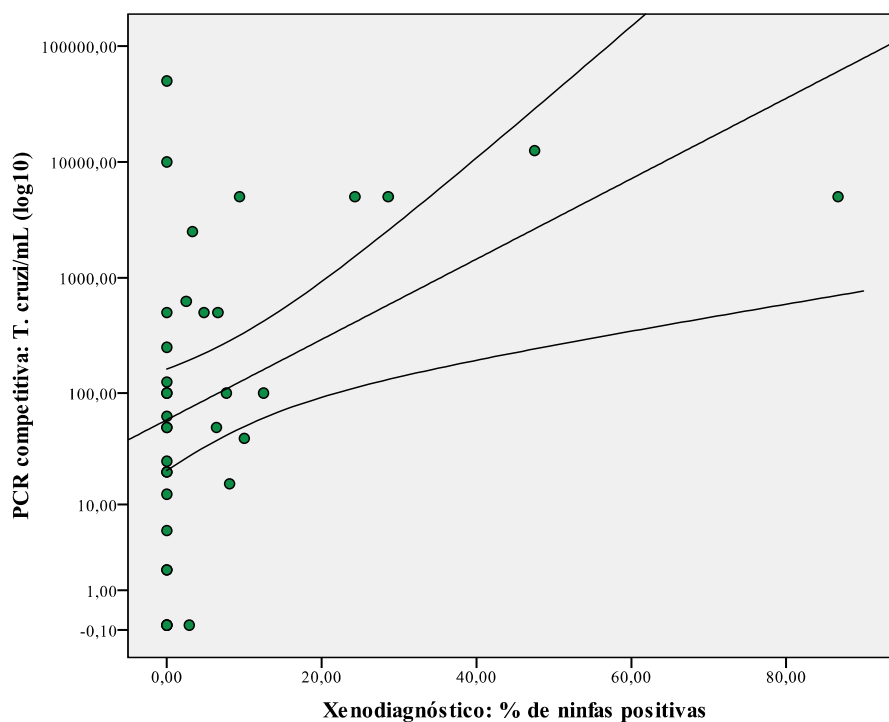


Figura 8 - Correlação entre número de cópias de *T. cruzi*/mL (\log_{10}) de sangue e % de ninfas positivas por xenodiagnóstico em 35 amostras. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = 0,456 e P = 0,006.

4.5.3. PCR competitiva (*T. cruzi*/mL de sangue) versus hemocultura quantitativa (% de tubos positivos)

Não foi observada correlação entre os resultados observados nos ensaios de PCR competitiva (*T. cruzi*/mL de sangue) e hemocultura (% de tubos positivos) aplicado a 37 amostras (**Figura 9**)

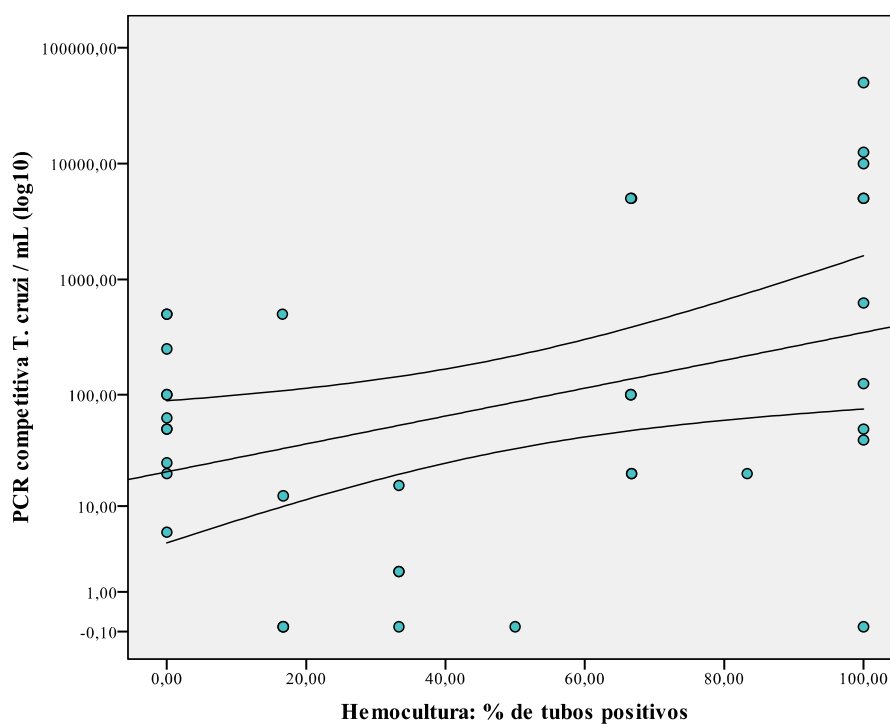


Figura 9 - Correlação entre número de cópias de *T. cruzi*/mL (\log_{10}) de sangue por PCR competitiva e % de tubos positivos por hemocultura em 39 amostras. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = 0,270 e P = 0,106.

4.5.4. PCR em tempo real TCZ3/TCZ4 (*T. cruzi*/mL de sangue) versus xenodiagnóstico quantitativo (% de ninfas positivas)

Foi observada fraca correlação entre os resultados de 57 amostras, uma por paciente) que apresentavam resultados de PCR em tempo real e xenodiagnóstico quantitativo concomitante (**Figura 10**).

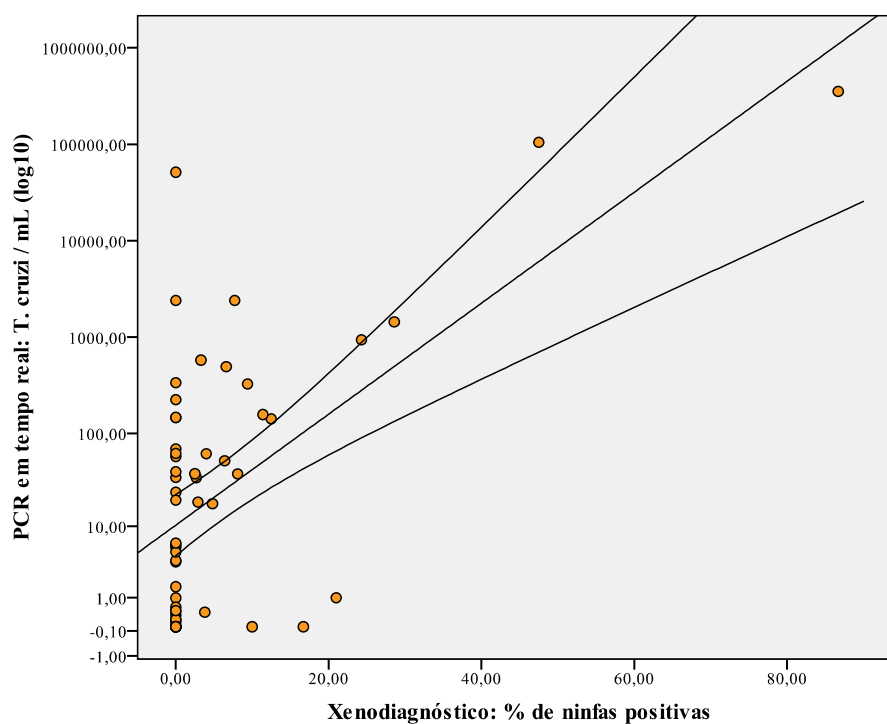


Figura 10. - Correlação entre número de cópias de *T. cruzi*/mL (\log_{10}) de sangue por PCR em tempo real e % de ninfas positivas por xenodiagnóstico em 57 amostras. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = 0,408 e P = 0,002.

4.5.5. PCR em tempo real TCZ3/TCZ4 (*T. cruzi*/mL de sangue) versus hemocultura quantitativa (% de tubos positivos)

Foi observada discreta correlação entre os resultados de 61 amostras que apresentavam resultados de PCR TCZ3/4 e hemocultura concomitantes. (**Figura 11**).

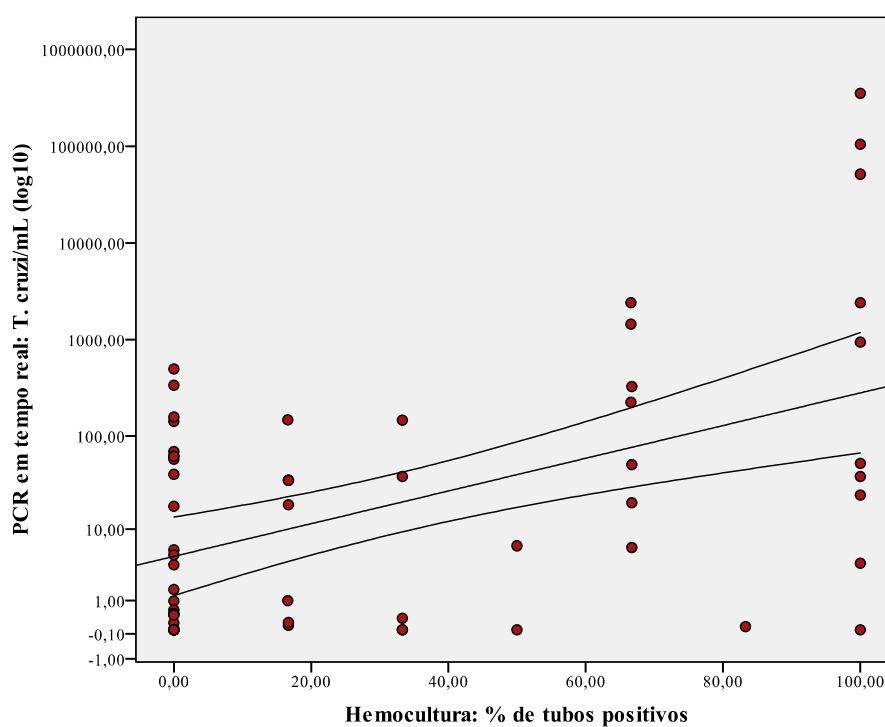


Figura 11 - Correlação entre número de cópias de *T. cruzi*/mL de sangue (log₁₀) por PCR em tempo real e % de tubos positivos por hemocultura em 59 amostras. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = 0,251 e P = 0,056.

4.5.6. PCR em tempo real TCZ3/TCZ4 (*T. cruzi*/mL de sangue) versus PCR competitiva (*T. cruzi*/mL de sangue)

A comparação dos resultados obtidos por PCR competitiva e em tempo real de 38 amostras de 38 pacientes pareadas apresentaram forte correlação: Spearman (Figura 12).

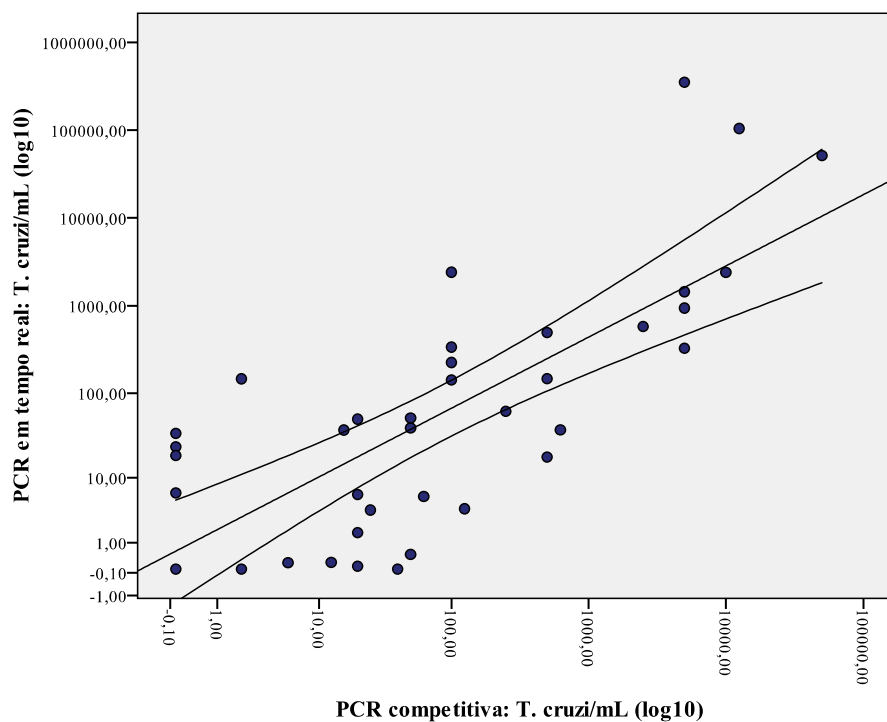


Figura 12 - Correlação entre 38 amostras da parasitemia obtida por PCR competitivo e PCR em tempo real. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = 0,724 e $P < 0,001$.

4.5.7. Sumário das análises de correlação (Coeficiente de Correlação de Spearman) entre xenodiagnóstico, hemocultura, PCR competitivo e PCR em tempo real.

Observa-se à **Tabela 7** um sumário dos resultados obtidos na análise de correlação dos dados quantitativos. Houve correlação entre xenodiagnóstico e hemocultura, entre xenodiagnóstico e PCR competitiva, entre PCR em tempo real e xenodiagnóstico e entre PCR em tempo real e PCR competitiva.

Tabela 7 - Sumário da análise dos dados quantitativos observados nos ensaios de hemocultura (HC), xenodiagnóstico (XD), PCR competitiva (PCR-C) e PCR em tempo real (PCR-RT) pelo Coeficiente de Correlação de Spearman.

Provas (Forma de leitura)	Spearman rs	P < 0,01	Amostras N
XD x HC (% ninfas +) x (% tubos +)	0,398	< 0,001	87
PCR-C x XD (<i>T. cruzi</i> /mL) x (% ninfas +)	0,456	= 0,006	35
PCR-C x HC (<i>T. cruzi</i> /mL) x (% tubos +)	0,270	= 0,106	37
PCR-TR x XD (<i>T. cruzi</i> /mL) x (% ninfas +)	0,408	= 0,002	57
PCR-TR x HD (<i>T. cruzi</i> /mL) x (% tubos +)	0,251	= 0,056	59
PCR-TR x PCR-C (<i>T. cruzi</i> /mL) x (<i>T. cruzi</i> /mL)	0,724	< 0,001	38

4.6. Análise comparativa dos grupos

4.6.1. Dados qualitativos

Na **Tabela 8**, observa-se a positividade dos três ensaios qualitativos: PCR, xenodiagnóstico e hemocultura de em 91 pacientes distribuídos segundo os grupos. A maior positividade foi observada entre os pacientes com reativação, seguido pelos pacientes com co-infecção *T. cruzi*/HIV e por fim pelos pacientes com doença crônica.

Tabela 8 - Positividade dos ensaios qualitativos: PCR S35/36, xenodiagnóstico (XD), hemocultura (HC) e Parasitológico indireto (xenodiagnóstico e hemocultura), nos grupos: crônico N=57 (CR) e co-infectado com e sem reativação N = 34 (CO + RE).

Grupos	PCR S35/36 % (N)	XD % (N)	HC % (N)	PI % (N)
CR	50,9 (57)	7,4 (54)	29,8 (57)	46,1 (57)
CO + RE	91,2 (34)	50,0 (34)	45,4 (33)	64,7 (34)
Total	65,9 (91)	23,9 (88)	35,5 (90)	43,9 (91)

A análise comparativa entre os grupos foi possível considerando como um grupo único pacientes com infecção por HIV com e sem reativação. Entre esses grupos foram observadas diferenças nos ensaios de S35/36 e de xenodiagnóstico, $p < 0,001$ (Teste Exato de Fisher) e considerando ambos os ensaios parasitológicos $p =$

0,002 (Qui quadrado). Quanto à hemocultura, não foi observada diferença significativa entre os grupos crônico e co-infectado + reativação (**Tabela 9**)

Tabela 9. - Análise da diferença entre os grupos crônico e co-infectado + reativado em relação aos exames de Xenodiagnóstico, Hemocultura, Parasitológico indireto (Xenodiagnóstico e Hemocultura) e PCR S35/S36.

Provas	Teste estatístico	<i>P</i> < 0,05*
Xenodiagnóstico*	Teste Exato de Fisher	< 0,001
Hemocultura	Qui-quadrado	= 0,136
Parasitológico Indireto*	Qui-quadrado	= 0,002
PCR S35/36*	Teste Exato de Fisher	< 0,001

4.6.2. Dados quantitativos

4.6.2.1. PCR competitiva

O ensaio semiquantitativo foi realizado com 38 amostras coletadas de 38 pacientes (17 com doença de Chagas crônica, 16 com co-infecção HIV/ *T. cruzi* e 5 com reativação da doença de Chagas). Na **Tabela 10** estão representados os valores de média, mediana e valores máximo e mínimo considerando os grupos de pacientes. Os maiores níveis de cópias de *T. cruzi* foram observados no grupo de pacientes com reativação da doença de Chagas, seguido pelo grupo com co-infecção sem reativação e por fim pelos pacientes com doença crônica, HIV negativos, a análise comparativa dos grupos está representada na **Figura 13**.

Tabela 10. Variação da parasitemia no ensaio de PCR competitiva, segundo os parâmetros média, mediana, máximo e mínimo, considerando os grupos de pacientes: crônicos (N = 17); com co-infecção (N = 16) e com reativação da doença de Chagas (N = 5).

Parâmetros	Grupos			Total
	CR (N = 17)	CO (N = 16)	RE (N = 5)	
Média ± dp	21,8 ± 31,3	964,0 ± 1685,8	16500,0 ± 19006,6	2586,7 ± 8398,0
Mediana	15,6	175,0	10000,0	56,2
Mínimo	0,0	0,0	5000,0	0
Máximo	125,0	5000,0	50000,0	50000

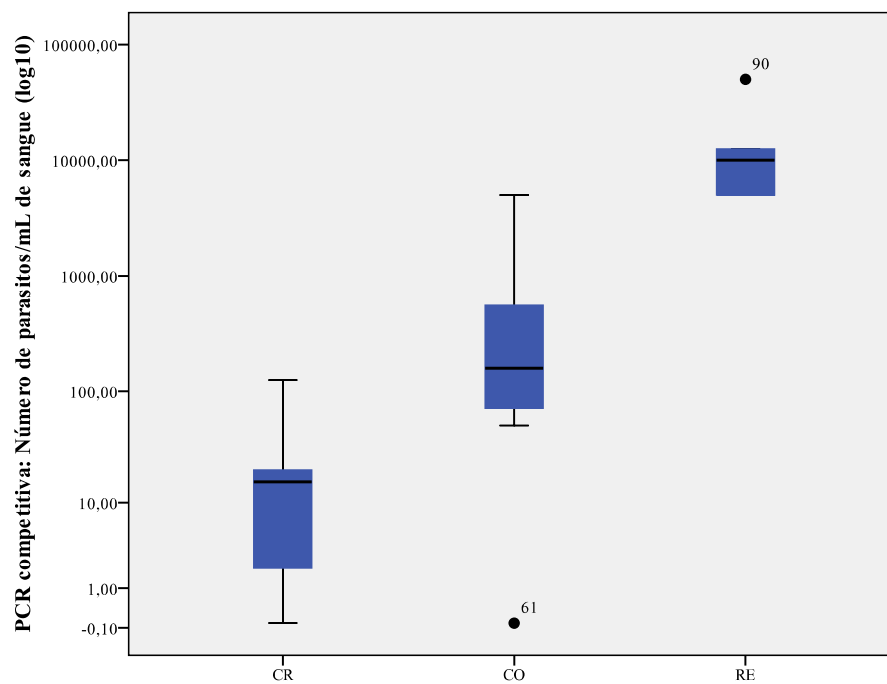


Figura 13 - Número de *T. cruzi*/mL (log10) por PCR competitiva em sangue segundo os grupos CR (n=17); CO (n=16) e RE (n=5). A linha representa a mediana dos valores. Kruskal Wallis $P < 0,001$ e a comparação entre os grupos: CR x CO $P < 0,001$; CR x RE, $P = 0,01$; CO x RE, $P = 0,02$ (Teste de Mann Whitney).

4.6.2.2. PCR em tempo real

Observa-se à **Tabela 11** e a **Figura 14** a análise dos dados referentes à parasitemia revelada por PCR em tempo real nos grupos crônico (CR = 29), com co-infecção (CO = 26) e com reativação da doença de Chagas (RE = 5), num total de 60 pacientes. Assim como ocorreu no ensaio de PCR competitiva, o grupo de pacientes com reativação da doença de Chagas apresentou maior parasitemia, em seguida o maior número de parasitos foi observado nos pacientes com co-infecção e, finalmente, o grupo de pacientes com doença crônica HIV negativo.

Tabela 11. - Variação da parasitemia no ensaio de PCR em tempo real, segundo os parâmetros média, mediana, máximo e mínimo, considerando os grupos de pacientes: crônicos (N = 29); com co-infecção (N = 26) e com reativação da doença de Chagas (N = 5).

Parâmetros	Grupos			Total
	CR (N = 29)	CO (N = 26)	RE (N = 5)	
Média ± dp	14,3 ± 30,6	255,1 ± 533,0	102235,3 ± 145950,1	8637,1 ± 47478,6
Mediana	1,0	54,3	51333,3	18,3
Minimo	0,0	0,0	939,0	0,0
Maximo	146,1	2405,0	352000,0	352000,0

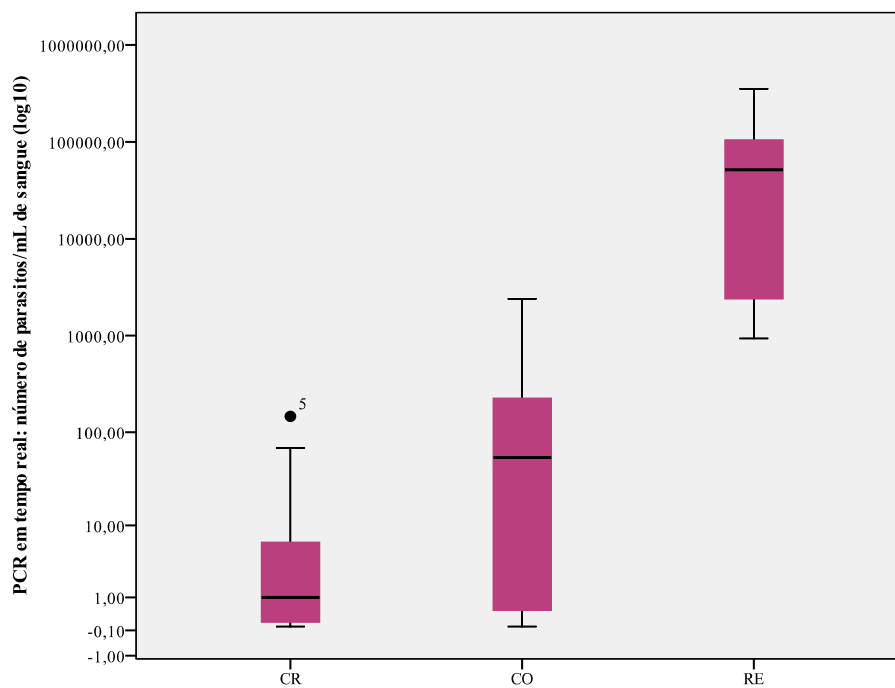


Figura 14 - Número de *T. cruzi*/mL (log₁₀) por PCR em tempo real em sangue segundo os grupos CR (n=29); CO (n=26) e RE (n=5). A linha representa a mediana dos valores. Kruskal Wallis $P < 0,001$ e a comparação entre os grupos: CR x CO, $P = 0,03$; CR x RE, $P < 0,001$; CO x RE, $P = 0,01$ (Mann Whitney).

4.6.2.3. PCR em tempo real: Grupo RE

Os cinco casos de reativação estão representados na **Figura 15**. Cinco amostras, três de sangue e duas de líquido, foram coletadas de 3 pacientes com reativação de SNC, todos com *T. cruzi* detectado no líquido por microscopia direta. A quantificação foi realizada em duas amostras de líquido e o número de cópias do parasito variou entre 508.000 a 1400000 *T. cruzi*/mL de líquido coletado, nestes pacientes foi realizada também a quantificação no sangue sendo detectados 51000 e 2400 *T. cruzi*/mL de sangue respectivamente. Em um paciente com reativação no SNC foi avaliada somente a amostra de sangue revelando grande quantidade de cópias do parasito, 105000 *T. cruzi*/mL de sangue coletado e 48% das ninfas positivas por xenodiagnóstico. Entre os pacientes com reativação no sangue, a PCR em tempo real revelou alta parasitemia 352000 *T. cruzi*/mL de sangue com 86,7 % de ninfas positivas, outro paciente, cuja porcentagem de ninfas positivas foi 24,3% apresentou um nível mais baixo de cópias do parasito 939 *T. cruzi*/mL de sangue coletado. Todos os pacientes com reativação no sangue ou no sistema nervoso central apresentaram no exame de hemocultura todos os tubos positivos.

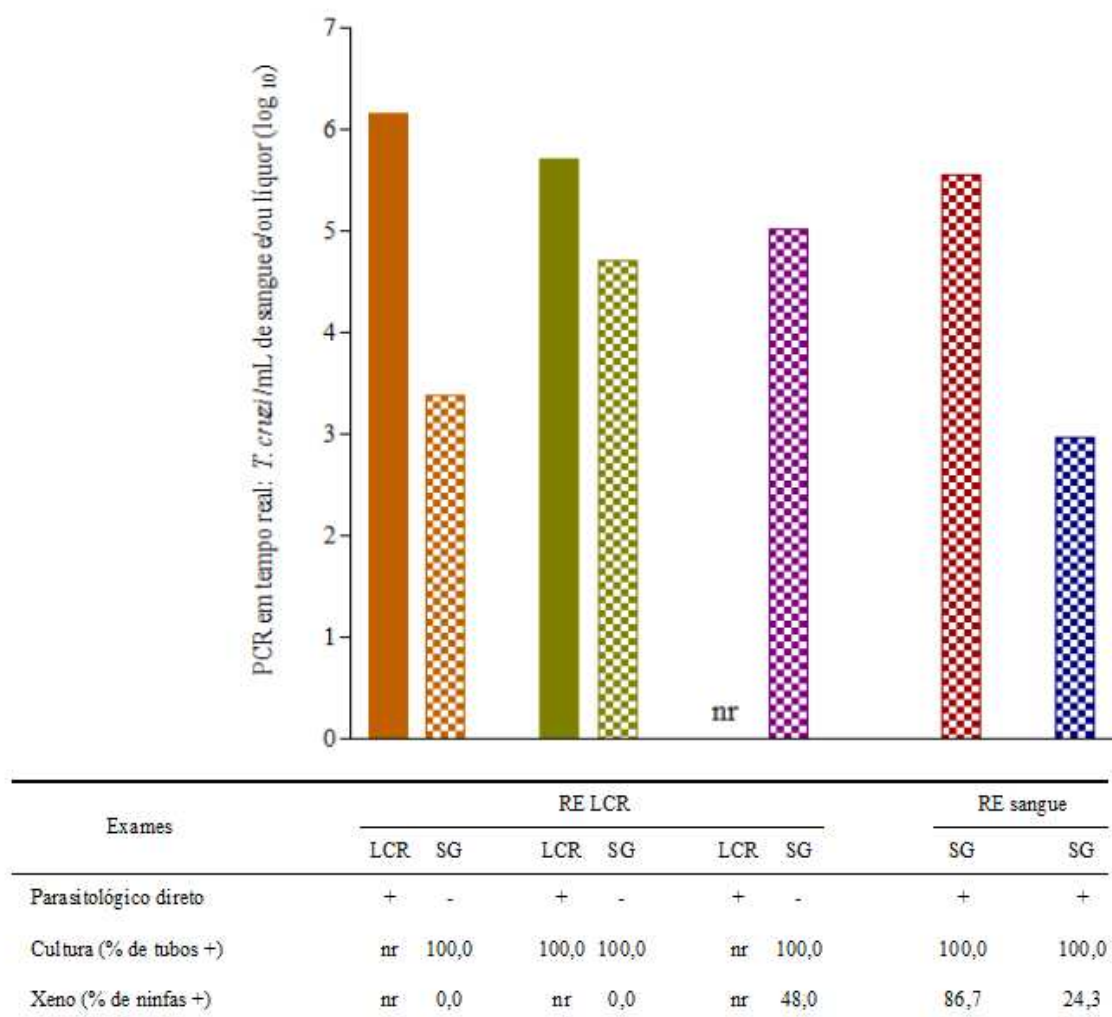


Figura 15 - Resultados observados por PCR em tempo real, exame direto (do sedimento ou QBC), xenodiagnóstico e cultura em amostras de sangue (SG) e/ou líquido (LCR) coletadas de 5 pacientes com reativação, 3 no SNC e 2 no sangue.

4.7. Correlação entre parasitemia e variáveis selecionadas nos pacientes HIV +: células T CD4+, CD8+ e Carga viral.

4.7.1. Parasitemia por PCR em tempo real e carga viral

Foram analisadas 20 amostras coletadas de pacientes HIV + (Grupos CO e RE), com registro de carga viral. Observou-se uma forte correlação entre a parasitemia determinada por PCR em tempo real (*T. cruzi*/mL de sangue) e a carga viral (cópias de RNA do vírus HIV/mL de plasma) (**Figura 16**).

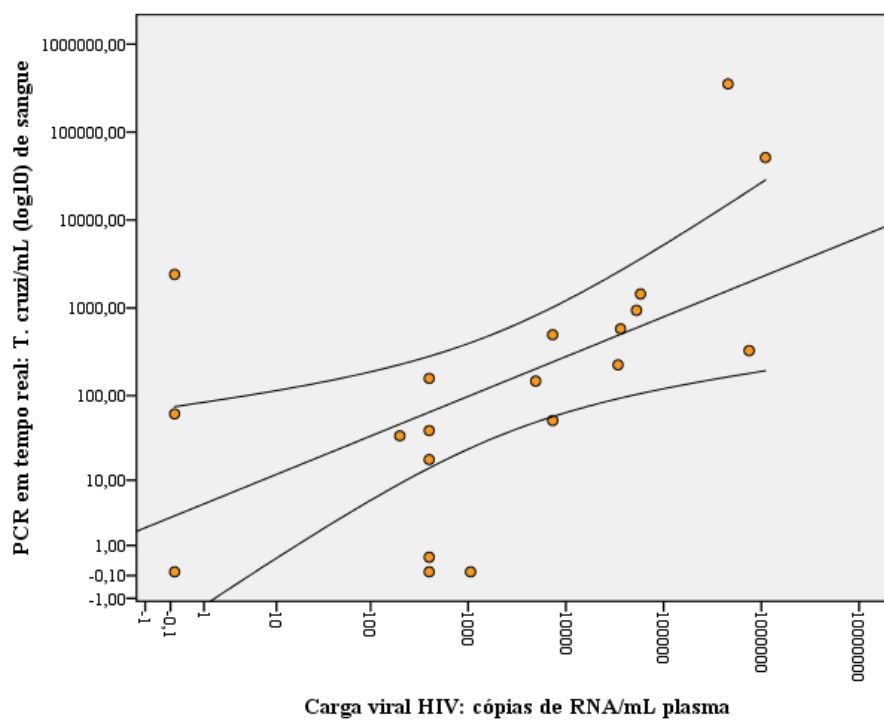


Figura 16 - Correlação entre parasitemia observada por PCR em tempo real (T. cruzi/mL de sangue) e carga viral HIV (cópias de RNA/mL de plasma) em 20 amostras de pacientes com co-infecção e reativação da doença de Chagas. Coeficiente de correlação de Spearman ($r = 0,619$ e $P = 0,004$).

4.7.2. Parasitemia por PCR em tempo real células T CD4+ e CD8+

Estudou-se a seguir a relação entre o número de parasitos/mL de sangue e as variáveis CD4+/mm³, CD8+/mm³ e razão CD4/CD8.

A relação observada entre *T. cruzi* /mL registrada por PCR em tempo real e o número de células T CD4 + pode ser observada na **Figura 19**.

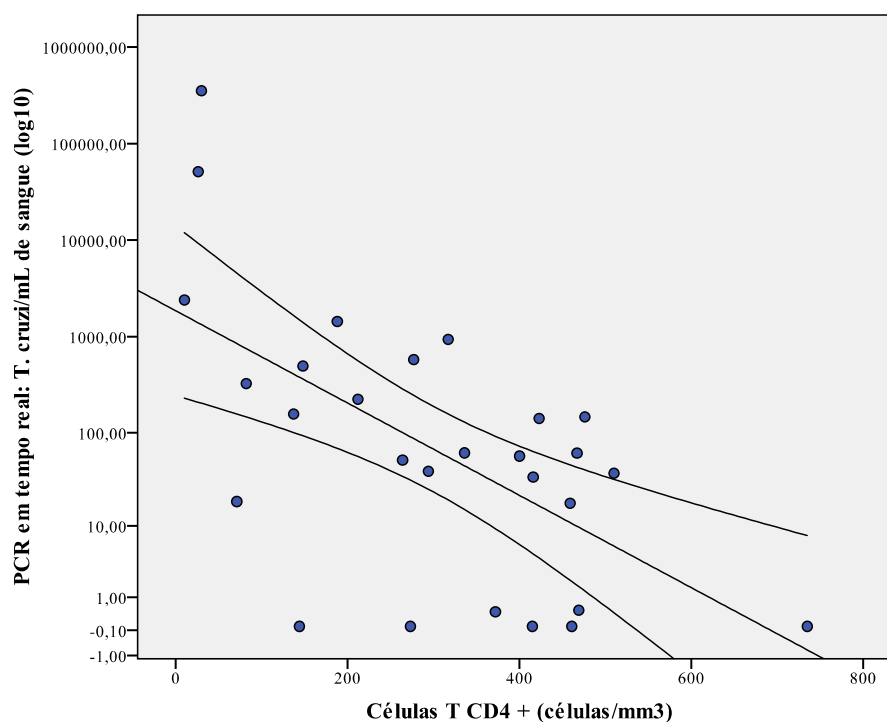


Figura 17 - Correlação entre parasitemia obtida por PCR em tempo real (*T. cruzi*/mL de sangue) e número de células T CD4 + (células / mm³) em 28 amostras de pacientes com co-infecção e reativação da doença de Chagas. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = - 0,542 e P = 0,003.

Na **Figura 18** não se observa correlação entre a parasitemia *T. cruzi*/mL de sangue observada por PCR em tempo real e o número de células T CD8 +/mm³.

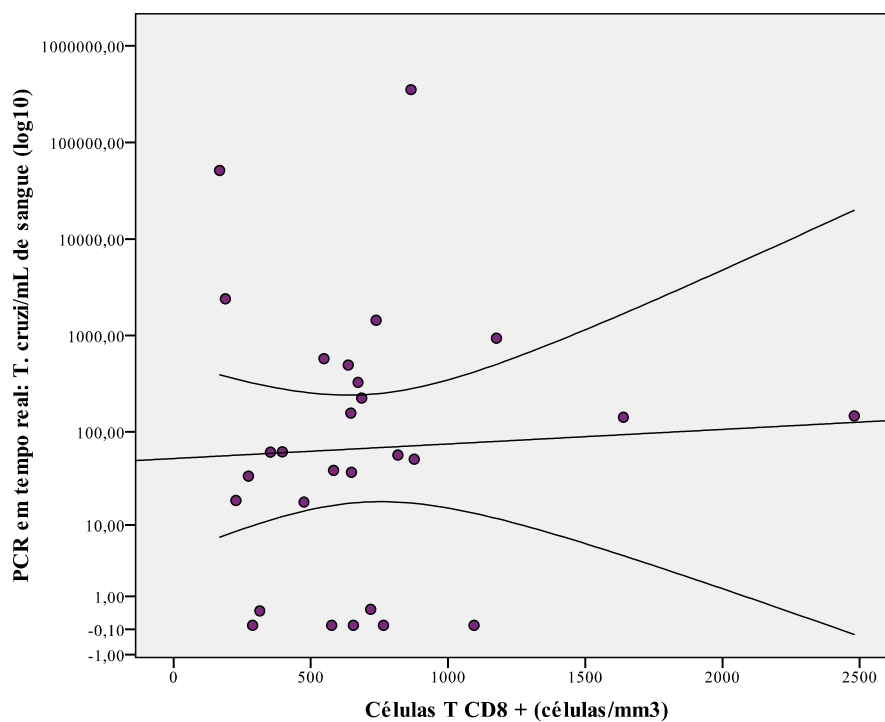


Figura 18 - Correlação entre parasitemia obtida por PCR em tempo real (*T. cruzi*/mL de sangue) e número de células T CD8 + (células/mm³) em 28 amostras de pacientes com co-infecção e reativação da doença de Chagas. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = 0,069 e P = 0,727.

Considerando a razão entre o número de células T CD4 +/mm³ e T CD 8 +/mm³ e a parasitemia *T. cruzi*/mL de sangue, uma correlação negativa e forte pode ser observada (**Figura 19**).

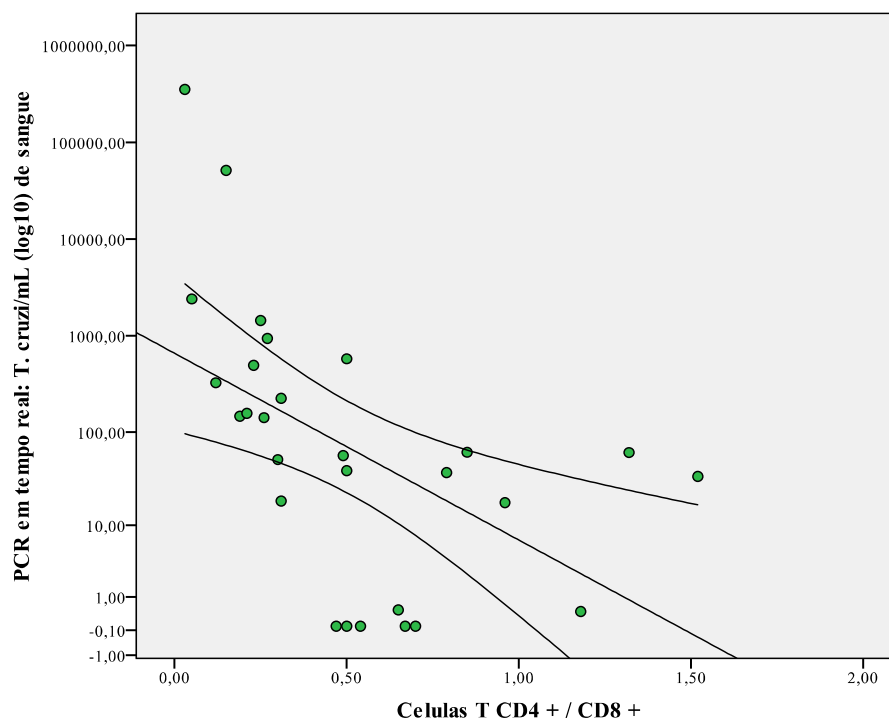


Figura 19. Correlação entre parasitemia obtida por PCR em tempo real (*T. cruzi*/mL de sangue) e a razão entre o número de células T CD4 + e T CD8 + em 28 amostras de pacientes com co-infecção e reativação da doença de Chagas. Coeficiente de correlação de Spearman (r) = -0,702 e $P < 0,001$.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Neste estudo, a importância de métodos moleculares para o diagnóstico e a quantificação do número de cópias de *T. cruzi* em pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi* foi demonstrada pela primeira vez, segundo nosso conhecimento por PCR em tempo real.

Adicionalmente, verificou-se que PCR em Tempo Real é capaz de distinguir pacientes com infecção por HIV e *T. cruzi* com e sem reativação da doença de Chagas. Embora tenha sido possível incluir apenas um pequeno número de pacientes com reativação, enfatiza-se o elevado número de cópias de DNA observado no sangue ou líquido desses pacientes com miocardite ou meningocencefalite. Em nosso estudo, a PCR em tempo real apresentou uma detecção igual a 0,1 fg de DNA de *T. cruzi* e eficiência de 93%, dentro dos limites estabelecidos de 90 a 100%, segundo Dorak, 2009.

Dois métodos moleculares quantitativos, PCR competitiva e PCR em tempo real mostraram forte correlação pelo coeficiente de Spearman (0,724), sugerindo sua utilidade para fins similares. No entanto, a PCR competitiva é mais trabalhosa e demanda mais tempo, requer maior quantidade de DNA. Uma das dificuldades observadas no presente experimento foi a necessidade utilização de 5 alíquotas de DNA por paciente. Adicionalmente, na execução da PCR competitiva nem sempre em um primeiro experimento permite observar o ponto de equivalência entre o competidor e o DNA do parasito presente na amostra do paciente, devendo proceder-se à repetição do ensaio com outras quantidades de DNA. Em nosso trabalho, cinco pacientes tiveram suas amostras testadas pelo menos 3 vezes, não se obtendo o ponto

de equivalência satisfatório. Todo esse processo demanda maiores gastos com reagentes e maior tempo. Um problema adicional é a leitura subjetiva do ponto de equivalência, que constitui uma das grandes desvantagens, necessitando da execução de eletroforese em gel de agarose. Na PCR em tempo real, a leitura é feita na fase log de amplificação de DNA por um software.

Dados anteriores na doença de Chagas crônica (Piron et al, 2007) mostraram 41% de resultados positivos por PCR em tempo real quando foram estudados pacientes crônicos ou mesmo mães de neonatos (Virreira et al, 2007) com doença congênita (<10 cópias/mL sangue), com menor número de cópia detectado do que em seus bebês com doença congênita (>1000 cópias/mL), mediante emprego de iniciadores derivados da seqüência de microssatélite. Outros dados em pacientes submetidos a transplante de coração com reativação da tripanossomíase comprovada por exame direto positivo mostraram um número de parasitos menor (Duffy et al, 2009) do que o observado no presente estudo.

Em relação às provas parasitológicas, nossos dados mostraram maior sensibilidade da PCR competitiva e PCR em tempo real em relação ao xenodiagnóstico e hemocultura. Também confirmaram dados mostrando maior sensibilidade da PCR qualitativa em relação às provas parasitológicas (Gomes et al, 1999; Junqueira et al, 1996; Wincker et al, 1997).

A PCR qualitativa S35/36 foi positiva em todas as 60 amostras selecionadas para PCR quantitativa, demonstrando alta sensibilidade com limite de detecção 2×10^{-16} (0,2 fg de DNA), correspondente a aproximadamente 1/100 de um *T. cruzi*. Esta sensibilidade, sem a aplicação de hibridização, é similar a observada na

literatura, em outros estudos que demonstraram sensibilidade variando entre 1 a 10 fg (Centurion-Lara et al, 1994; Lindoso, 1998 e Gomes et al 1998).

Apenas 81,7% das amostras positivas por PCR qualitativa S35/36 foram positivas por PCR em tempo real, podendo este resultado ser atribuído às diferentes seqüências amplificadas. Entre os fatores que contribuíram para a escolha deste par de iniciador, tem-se os tamanhos dos produtos amplificados por PCR qualitativo e quantitativo e a sua especificidade que no nosso estudo é melhor que o apresentado por Virreira et al (2007).

Na comparação com os exames parasitológicos a PCR qualitativa demonstrou maior sensibilidade no diagnóstico de pacientes com doença de Chagas do que os exames parasitológicos, condizentes com os observados na literatura (Borges-Pereira et al, 1984; Borges-Pereira et al, 1987; Ávila et al, 1993; Wincker et al, 1994; Britto et al, 1995; Gomes et al, 1999; Lages-Silva et al, 2001). Diferentemente das técnicas parasitológicas (hemocultura e xenodiagnóstico), a PCR não depende da integridade do parasito para detectá-lo, fragmentos de DNA devidamente conservados em solução tampão podem ser purificados. Além disso, o parasito apresenta várias seqüências de DNA repetitivo no genoma, propiciando maior sensibilidade.

As vantagens da PCR qualitativa residem não só na maior sensibilidade como no período necessário para o resultado final (1 a 2 dias) em relação ao total de 30 a 90 dias para o xenodiagnóstico e 30 a 120 dias para hemocultura. Deve-se também considerar menor risco na manipulação dos materiais que são contaminados pelo parasito nas provas parasitológicas, a necessidade de manutenção dos triatomídeos no caso do xenodiagnóstico. Acrescenta-se o período de trabalho para a realização de leituras, que é maior nos métodos parasitológicos, se o primeiro resultado não for

positivo. A grande vantagem do método parasitológico é a especificidade, que pode ser conseguida no método molecular sem o grau de segurança de se visualizar o parasito. Para tal contribuiu a escolha dos iniciadores e todos os cuidados para se evitar contaminação desde a coleta de sangue até a identificação do produto amplificado. Como exemplo, a utilização de amostra de indivíduos controles inicia-se com o pareamento de cada amostra de paciente com a amostra de um controle no momento da extração, em cada ambiente seja de preparo de reagentes ou de aplicação de DNA, foram utilizados controles negativos. Todos estes procedimentos propiciaram maior segurança em relação aos resultados, visto que a maior desvantagem neste tipo de técnica são os resultados falso positivos devido à contaminação.

Padronizada por Centurion-Lara em 1994, sua utilidade tem sido mais correlacionada ao monitoramento de pacientes com doença de Chagas crônica ou congênita pré e pós terapêutica específica (Lauria-Pires et al, 2000; Schijman et al, 2003). Há um relato sobre a aplicação da PCR competitiva, para fins de monitoramento da parasitemia durante a terapêutica em um paciente com doença de Chagas HIV positivo (Burgos et al, 2005), constituindo-se o nosso trabalho no primeiro relato envolvendo vários pacientes com infecção *T cruzi*/HIV.

A comparação dos exames de xenodiagnóstico (porcentagem de ninfas positivas) e hemocultura (porcentagem de tubos positivos) com a PCR em tempo real, mostrou fraca correlação, explicada pela baixa sensibilidade do xenodiagnóstico e hemocultura em relação a PCR em tempo real. Assim o xenodiagnóstico apresentou-se negativo em 44,8% e a hemocultura em 33,8% dos pacientes que tiveram a parasitemia detectada por PCR em tempo real.

Consideradas todas as dificuldades para execução da PCR competitiva a prioridade para quantificação foi dada a PCR em tempo real. Todas as 60 amostras positivas pela PCR qualitativa puderam ser testadas por PCR em tempo real.

Considerando os diferentes grupos estudados, a análise dos dados demográficos não demonstrou diferença entre os grupos em relação ao gênero, mas houve diferença significativa da idade (anos) entre os grupos CR e RE, este último grupo composto por 5 pacientes mais jovens. Deve-se considerar a pequena frequência de pacientes com co-infecção, sendo de interesse ressaltar que os grupos CR e CO são similares em relação à idade. O grupo RE representa o número de pacientes observados no período e por si só é pequeno, não sendo possível o controle da faixa etária.

Em relação aos resultados qualitativos, a maior positividade, observada no grupo CO em comparação a CR, foi detectada tanto por PCR como por xenodiagnóstico. O controle do parasito *T. cruzi* depende da resposta do sistema imune, a imunodeficiência decorrente da infecção pelo vírus HIV provoca um desequilíbrio nessa relação, com conseqüente multiplicação do parasito, que tem a capacidade de se evadir dos mecanismos de controle. Estudos prévios demonstraram, através do xenodiagnóstico, um aumento substancial na parasitemia (*T. cruzi*) em pacientes com infecção pelo vírus HIV (Perez-Ramirez et al, 1999; Sartori et al, 1998b; 2002). Apesar destes dados demonstrarem maior parasitemia nos pacientes com co-infecção, apenas os resultados qualitativos não são suficientes para detectar um processo de reativação, em função de sua positividade em pacientes com doença de Chagas crônica. Neste caso, provas quantitativas são mais úteis para monitorar a evolução da parasitemia.

Com exceção da hemocultura, o xenodiagnóstico, as PCRs competitiva e em tempo real demonstraram diferença significativa na parasitemia observada nos grupos de pacientes com doença crônica e co-infectados. Esses resultados são corroborados por relatos anteriores que demonstraram a parasitemia através da percentagem de ninfas positivas por xenodiagnóstico (Perez-Ramirez et al,1999; Sartori et al, 2002a).

A comparação entre pacientes com reativação e co-infectados sem reativação permitiu observar pela primeira vez diferença estatisticamente significativa considerando a hemocultura (percentagem de tubos positivos), PCRs competitiva e em tempo real. Esses ensaios quantitativos permitem ter uma melhor avaliação do nível de parasitemia nos diferentes grupos de pacientes.

Entre os pacientes com doença crônica e HIV negativos, a variação da parasitemia (0 a 140 *T. cruzi*/mL de sangue) foi menor que nos pacientes com co-infecção (0 a 2400), este fato nos levou a analisar as outras variáveis que poderiam influenciar na quantidade de *T. cruzi* nesses pacientes: carga viral, células T CD4 + e CD8 + (Perez-Ramirez et al, 1999; Sartori et al, 2002a; 2002b).

O presente trabalho conseguiu demonstrar correlação positiva e forte entre *T. cruzi* e carga viral, condizente com um estudo experimental mostrando agravamento da infecção por vírus da leucemia murina em camundongos infectados com *T. cruzi* (Silva et al 1993). O aumento simultâneo da carga viral e de positividade em técnicas parasitológicas também foi demonstrado em hospedeiros humanos por Sartori et al, 2002b.

Em relação à quantidade de células T CD4+/mm³ observamos que seu número é inversamente proporcional à quantidade de *T. cruzi*, consistente com vários relatos que ressaltam a importância destas células no controle do protozoário. Ao

contrário, as células CD8 $+/\text{mm}^3$ embora não tivessem apresentado qualquer correlação com a quantidade de *T. cruzi*, induzem a produção de citocinas com atividade microbicida como INF γ capaz de induzir a produção de NO pelos macrófagos e, segundo relatos recentes, nas células musculares (Martin e Tarleton, 2004). Ressalta-se que no presente trabalho, a comparação foi realizada apenas com o número de células T CD8 +, não se tendo avaliado sua função.

Evidenciou-se forte correlação entre a quantidade de *T. cruzi* e razão CD4 $+$ /CD8 $+$, sugerindo a importância dessas células no controle da parasitemia. Esses resultados podem ser parcialmente entendidos à luz de trabalhos anteriores como de Rottenberg et al (1993), que demonstraram alta parasitemia por *T. cruzi* em camundongos T CD4 - e CD8 +, sendo menor a parasitemia em animais CD4 + e CD8 -, porém menor a sobrevida.

Neste estudo, entre os pacientes com reativação, um caso assintomático apresentou um número de cópias relativamente baixo por PCR em tempo real, 939 parasitos/mL de sangue, porém maior que a média e o desvio padrão do grupo CO (255,1 \pm 533,0). O número de parasitos por PCR competitivo foi de 5000/mL e infelizmente neste caso não havia mais amostras para novo processamento. O estudo de outras variáveis mostrou CD4 + = 317 mm^3 , razão CD4 $+$ /CD8 $+$ = 0,27 e carga viral de HIV 52831/mL.

A análise deste paciente exemplifica a necessidade de monitoramento prospectivo da parasitemia e dos fatores associados em diferentes períodos, devendo ser repetida face ao aparecimento de alteração significativa de alguma das características anteriores quer seja carga parasitária, viral, nível de CD4 $+/\text{mm}^3$ ou razão CD4 $+$ /CD8 $+$.

Enfatiza-se que a reativação ocorre em cerca de 20% de pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi* (Sartori et al, 2007) e evolui com 80% de letalidade quando o período de tratamento é menor que 30 dias em contraste com a letalidade de 20% apresentada por pacientes tratados por mais de 30 dias (Del Castilho et al, 1990; Gluckstein et al, 1992, Ferreira et al, 1997, Sartori et al, 1995, 1998a, 1998b, 1999, 2002a, 2002b, 2007; Santos et al, 1999; Silva et al, 1999; Cordova et al, 2008).

Tendo demonstrado, pela primeira vez, segundo nosso conhecimento, a utilidade da PCR em Tempo Real para distinguir o nível de parasitemia em pacientes infectados por HIV com e sem reativação da doença de Chagas, propomos seu emprego como um marcador da terapêutica pré-emptiva em pacientes com doença de Chagas sob imunossupressão.

Adicionalmente, consideramos ser fundamental a validação do PCR em Tempo Real em estudos prospectivos como marcador de terapêutica pré-emptiva da doença de Chagas em pacientes co-infectados em associação à carga viral e diminuição do número de CD4⁺/mm³ e da razão CD4⁺/CD8⁺, conforme demonstrado em nosso estudo. Com efeito, recomenda-se um diagnóstico precoce antes do início de sintomas da reativação da doença de Chagas como uma estratégia para garantir o sucesso da terapêutica pré-emptiva, contribuindo para a diminuição da elevada letalidade nesses pacientes.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A PCR em tempo real foi capaz de detectar níveis de parasitemia significativamente diferentes em pacientes: com infecção por HIV/*T. cruzi*, com e sem reativação da Doença de Chagas crônica.
2. Os níveis de parasitemia por PCR em tempo real foram também diferentes em pacientes co-infectados por HIV/*T. cruzi* e sem reativação da doença de Chagas comparativamente a pacientes apenas com a doença de Chagas crônica.
3. A PCR qualitativa com S35/36 foi mais sensível do que o xenodiagnóstico e a hemocultura e do que o xenodiagnóstico + hemocultura
4. Houve importante correlação entre os níveis de *T. cruzi*/mL detectados por PCR quantitativa e PCR competitiva na análise de amostras de pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi*
5. Houve importante correlação entre os níveis de *T. cruzi*/mL detectados por PCR quantitativa e a carga viral de HIV em pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi*
6. Houve importante correlação entre os níveis de *T. cruzi*/mL detectados por PCR quantitativa e os níveis de CD4/mm³ pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi* e a razão CDR+/CD8+.
7. O elevado nível de parasitemia observado por técnicas moleculares quantitativas, associadamente à elevação de carga viral e diminuição dos níveis de CD4/mm³ e da razão CD4+/CD8+ sugere a utilidade desses marcadores em pacientes sob risco de reativação da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akvahan D. Análise de custo efetividade do programa de controle da doença de Chagas no Brasil: relatório final. Brasília; OPAS; 2000. 271p
- Amato-Neto V, Lopes MH, De Marchi CR, Silva, MFS. Tentativa de evidenciar o *Trypanosoma cruzi* no sangue periférico de pacientes com doença de Chagas, em fase crônica por meio de quantitative buffy coat (QBC). *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31:231-3.
- Apt W, Arribada A, Zulantay I, Solari A, Sánchez G, Mundaca K, Coronado X, Rodríguez J, Gil LC, Osuna A. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann Trop Med Parasitol.* 2005; 99: 733-41.
- Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: Diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol.* 1991; 48: 211-22.
- Avila HA, Borges-Pereira J, Thiemann O, Paiva E, Degrave W, Morel C M, Simpson L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 2421-6.
- Benvenuti L A, Rogério A, Sambiase N V, Fiorelli A, Higuchi M L. Polymerase chain reaction in endomyocardial biopsies for monitoring reactivation of Chagas'

- disease in heart transplantation: a case report and review of the literature. *Cardiovasc Pathol.* 2005; 14: 265-8.
- Bestetti RB, Cury PM, Theodoropoulos TA, Villafanha D. *Trypanosoma cruzi* myocardial infection reactivation presenting as complete atrioventricular block in a Chagas' heart transplant recipient. *Cardiovasc Pathol.* 2004; 13: 323-6.
- Borges-Pereira J, Coura J R. Morbidade da doença de Chagas em populações urbanas do Sertão da Paraíba. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987; 20:101-7.
- Britto C, Cardoso M A, Ravel C, Santoro A, Borges-Pereira J, Coura J R, Morel C M, Wincker P. *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from Northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol.* 1995; 81: 462-71.
- Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macêdo V, Fernandes O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96: 823-6.
- Burgos JM, Begher SB, Freitas JM, Bisio M, Duffy T, Altcheh J, Teixeira R, Lopez Alcoba H, Deccarlina F, Freilij H, Levin MJ, Levalle J, Macedo AM, Schijman AG. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73:1016-8.
- Callegari-Jaques SM. Bioestatística: Princípios e aplicações. 1^a ed. Porto Alegre. Artmed Editora SA. 2003. Cap. 18, p.165-84. Testes não paramétricos.

- Carrazone CFV, Brito AM, Gomes YM. Importância da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004; 26: 93-8.
- CDC. Chagas disease after organ transplantation - United States, 2001. *MMWR* 2002, 51: 210-2.
- CDC. Chagas disease after organ transplantation - Los Angeles, Califórnia, 2006. *MMWR* 2006, 55: 798-800.
- Centurion-Lara A, Barret L, Van Voorthis WC. Quantitation of parasitemia by competitive polymerase chain reaction amplification of parasite kDNA minicircles during chronic infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis.* 1994; 170: 1334-8.
- Chiari E, Brener Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1966; 8: 134-8.
- Chiari E, Dias J C P, Lana M, Chiari C A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989; 22: 19-23.
- Cohen JE, Tsai EC, Ginsberg HJ, Godes J. Pseudotumoral chagasic meningoencephalitis as the first manifestation of acquired immunodeficiency syndrome. *Surg Neurol.* 1998; 49: 324-7.
- Cordova E, Boschi A, Ambrosioni J, Cudos C, Corti M. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-injected patients in Argentina, 1992-2007. *J Infect Dis.* 2008; 12: 587 – 92.
- Cummings K L, Tarleton R L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 129: 53-9.

- D'Avila SC, D'Ávila AM, Pagliari C, Gonçalves VM, Duarte MI. Erythema nodoso in reactivation of Chagas' disease after cardiac transplantation. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38: 61-3.
- Degrave W, Fragoso SP, Britto C, Heurvrswyn GZ, Kidane AB, Cardoso U, Mueller L, Simpson L, Morel CM. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1988; 27: 63-70.
- Del Castillo M, Mendoza G, Oviedo J, Perez-Bianco RP, Anselmo AE, Silva M. AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion. *Am J Med.* 1990; 88: 693-4.
- Dias JCP, Schofield CJ. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na iniciativa do Cone Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 3: 373-83.
- Dias JC, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med.* 2008; 41: 193-6.
- Diez M, Favaloro L, Bertolotti A, Burgos JM, Vigliano C, Lastra MP, Levin M J, Arnedo A, Nagel C, Schijman AG, Favaloro RR. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *Am J Transplant.* 2007; 7: 1633-40.
- Dorak M T. Real Time PCR (Advanced Methods Series). Oxford: Taylor & Francis, 1a ed, 333 pp, 2006
- Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(4):e419. Epub 2009.

- Fernandes A J, Diotaiuti L, Azevedo B V M, Busek S U, Chiari E. Viabilidade da utilização da hemocultura no diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em amostras coletadas em condição de campo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1995; 28: 123.
- Fernandes CD, Tiecher FM, Balbinot MM, Liarte DB, Scholl D, Steindel M, Romanha A. Efficacy of beznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow up. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 27-32.
- Ferreira MS, Nishioka SDEA, Silvestre MT, Borges AS, Nunes-Araujo FR, Rocha A. Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 1997; 25: 1397-400.
- Ferreira AW; Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara e Koogan S.A., 2001. 241-54.
- Fiorelli AI, Stolf NA, Honorato R, Bocchi E, Bacal F, Uip D, Strabelli T, Issa V, Amato VA, Fiorelli LR, Oliveira SA. Later evolution after cardiac transplantation in Chagas' disease. *Transplant Proc.* 2005; 37: 2793-8.
- Freilij H, Muller L, Gonzalez-Cappa SM. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas disease. *J Clin Microbiol.* 1983; 18: 327-30.
- Freilij H, Altchek J. Congenital Chagas's disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis.* 1995a; 21: 551-5.
- Freilij H, Altchek J, Muchinik G. Perinatal human immunodeficiency virus infection and congenital Chagas' disease. *Pediatric Infect Dis J.* 1995b; 14: 161-2.

- Galhardo MC, Martins IA, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Coelho JM, Junqueira AC, Dos Santos RR. Reativação da infecção por *Trypanosoma cruzi* em paciente com síndrome de imunodeficiência adquirida. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32: 291-4.
- Gallerano V, Consigli J, Pereyra S, Gómez Zanni S, Danielo C, Gallerano RH, Guidi A. Chagas' disease reactivation with skin symptoms in a patient with kidney transplant. *Int J Dermatol*. 2007; 46: 607-10.
- Gluckstein D, Ciferri F, Ruskin J. Chagas' disease: another cause of cerebral mass in acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*. 1992; 92: 429-32.
- Gomes M L, Macedo A M, Vago A R, Pena S D J, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: optimization da polimerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitolol*. 1998; 88: 28-33.
- Gomes M L, Galvão L M C, Macedo A M, Pena S D J. Chagas disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 60: 205-10.
- Junqueira A C V, 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*. 1996; 90: 129-32.
- Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol*. 1996; 35: 1171-5.
- Lages-Silva E, Ramirez LE, Silva-Vergara ML, Chiari E. Chagasic meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome:

- diagnosis, follow-up, and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 118-23.
- Leiby DA, Herron RM Jr, Garratty G, Herwaldt BL. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in US blood donors with serologic evidence of infection. *J Infect Dis*. 2008; 198: 609-13.
- Lescure FX, Canestri A, Melliez H, Jauréguiberry S, Develoux M, Dorent R, Guiard-Schmid JB, Bonnard P, Ajana F, Rolla V, Carlier Y, Gay F, Elghouzzi MH, Danis M, Pialoux G. Chagas disease, France. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 644-6.
- Lauria-Pires L, Braga M S, Vexenat A C, Nitz N, Simões-Barbosa A, Tinoco D L, Teixeira A R L. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Méd Hyg*. 2000; 63: 111-8.
- Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brenner, Z; Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan. 2ª ed. p. 334-78. 2000.
- Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1994; 27: 143-8.
- Marchiori PE, Alexandre PL, Britto N, Patzina RA, Fiorelli AA, Lucato LT, Rosemberg S, Pereira ALA, Stolf NG, Scaff M. Late Reactivation of Chagas' Disease Presenting in a Recipient as an Expansive Mass Lesion in the Brain after Heart Transplantation of Chagasic Myocardiopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2007; 26: 1091-6.

- Marcon GE, Andrade PD, De Albuquerque DM, Wanderley JDAS, De Almeida EA, Guariento ME, Costa SC. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 43: 39-43.
- Martin D; Tarleton R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immun Reviews*. 2004; 201: 304-17.
- Ministério da Saúde. Brasil elimina transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/notatecnica_chagas0806.pdf acesso em 28/07/2009.
- Mora M X C. Avaliação de uma técnica modificada de hemocultura para *T. cruzi*, na forma crônica da doença de Chagas em uma área endêmica. *Rev Soc Med Trop São Paulo* 1996; 29: 515-6.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989; 27:1477-82.
- Motta VT, Oliveira-Filho PF. SPSS: Análise de dados biomédicos. 1ª ed. Rio de Janeiro. Editora Científica LTDA. 2009.
- Nisida IVV, Amato-Neto V, Braz LMA, Duarte MIS, Umezawa ES. A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three health institutions, São Paulo city, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1999; 41: 305-11.
- Ochs D E, Hnilica V C, Moser D R, Smith J H, Kirchhoff L V. Postmortem diagnosis of autochthonous acute chagasic myocarditis by PCR amplification of a species-specific DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54: 526-9.

- OPS. Iniciativa de los países del Cono Sur. Primera reunión de la Comisión Intergubernamental para la eliminación del *Triatoma inestans* y la interrupción de la transmisión de la Trypanosomiasis americana por transfusión. 1992. Buenos Aires, Argentina 1992. Doc OPS/PNSP/92.18.
- Pagano MA, Segura MJ, Di Lorenzo GA, Garau ML, Molina HA, Cahn P, Perez H, Vitolo F, Grondona A, Piedimonte FC, Giannaula R, Ramia R, Miranda M A, Sierra H, Sica RE. Cerebral tumor-like American trypanosomiasis in acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Neurol*. 1999; 45: 403-6.
- Perez-Ramirez L, Barnabé C, Sartori AMC, Ferreira MS, Tolezano JE, Nunes EV, Burgarelli MK, Silva AC, Shikanai-Yasuda MA, Lima JN, Da-Cruz AM, Oliveira OC, Guilherme C, Bastrenta B, Tibayrenc M. Clinical analysis and parasite genetic diversity in human immunodeficiency virus/Chagas' disease coinfections in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 61:198-206.
- Pineda J P, Luquetti A. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31: 473-80.
- Pinto AY, Valente SA, Valente VC, Ferreira-Junior AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev. Soc Bras Med Trop*. 2008; 41:602-14.
- Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Prat J G, Portus M, Sauleda S. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*. 2007; 103: 195-200.

- Portela-Lindoso AA, Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saude Publica*. 2003; 37: 107-15.
- Portela-Lindoso AA. 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. Dissertação de Mestrado. São Paulo. Faculdade de Medicina USP; 1998.
- Rivera J, Hillis LD, Levine BD. Reactivation of cardiac Chagas' disease in acquired immune deficiency syndrome. *Am J Cardiol*. 2004; 94: 1102-3.
- Rottenberg M, Bakhiet M; Olsson T, Kristensson K, Mak T, Wigzell H, Orn A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*. 1993; 61: 5129-33.
- Russomano G, Tomassone MC, Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, Candia N, Calcena MF, Figueredo A. Treatment of congenital Chagas disease diagnosed and followed up by polymerase chain reaction. *Am J Trop Méd Hyg*. 1998; 59: 487-91.
- Santos M C A, Slegers C A, Silveira C A, Castro C, Santiago W. Estudos comparativos entre xenodiagnóstico artificial e hemocultura para doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32 (Supl 2): 81.
- Santos SS, Almeida GMD, Monteiro MLR, Gemignani P, Duarte MIS, Toscano CM, Barone AA. Ocular myositis and diffuse meningoencephalitis from *Trypanosoma cruzi* in an AIDS patient. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. 1999; 93: 535-6.

- Sartori AMC, Lopes MH, Caramelli B, Duarte MI, Pinto PL, Amato-Neto V, Shikanai-Yasuda MA. Simultaneous occurrence of acute myocarditis and reactivated Chagas' disease in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1995; 21: 1297-9.
- Sartori AMC, Lopes MH, Benvenuti LA, Caramelli B, Di Pietro AO, Nunes EV, Ramirez LP, Shikanai-Yasuda MA. Reactivation of Chagas' disease in a human immunodeficiency virus-infected patient leading to severe heart disease with a late positive direct microscopic examination of the blood. *Am J Trop Med Hyg.* 1998a; 59: 784-6.
- Sartori AMC, Shikanai-Yasuda MA, Amato-Neto V, Lopes MH. Follow-up of 18 patients with human Reactivation immunodeficiency virus-infection and chronic Chagas' disease, with reactivation of Chagas' disease causing cardiac disease in three patients. *Clin Infect Dis.* 1998b; 26: 177-9.
- Sartori AMC, Sotto MN, Braz LMA, Júnior OCO, Patzina RA, Barone AC, Shikanai-Yasuda MA. Reactivation of Chagas disease manifested by skin lesions in a patient with AIDS. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 1999; 93: 631-2.
- Sartori AMC, Eluf JE, Nunes EV, Braz LMA, Caiiffa-Filho HH, Oliveira OC, Amato-Neto V, Shikanai-Yasuda MA. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV) – positive and HIV - negative patients. *J Infect Dis.* 2002a; 186: 872-5.
- Sartori AMC, Caiiffa Filho HC, Bezerra RC, Guilherme CS, Lopes MH, Shikanai-Yasuda MA. Exacerbation of HIV viral load simultaneous with asymptomatic reactivation of chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2002b; 67: 521-3.

- Sartori AMC, Ibrahim KY, Nunes Westphalen EV, Braz, LM, Oliveira OCJR, Gakiya E, Lopes MH, Shikanai-Yasuda MA. Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. *Ann Trop Med Parasitol.* 2007; 101: 31-50.
- Schijman AG, Vigliano C, Burgos J, Favaloro R, Perrone S, Laguens R, Levin MJ. Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *J Heart Lung Transplant.* 2000; 19: 1114-7.
- Schijman A G, Altcheh J, Burgos J M, Biancardi M, Bisio M, Levin M J, Freilij H. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52: 441-9.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Osw Cruz.* 2007, 102:75-85.
- Silva J S, Barral-Neto M; Reed S G. Aggravation of both *Trypanosoma cruzi* and murine leukemia virus by concomitant infections. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 49: 589-97.
- Silva N, O'Brien L, Medeiros E, Holand H, Suleiman J, Mendonça JS, Patronas N, Reed SG, Klein HG, Masur H, Badaró R. *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in HIV infected patients. *Journal of AIDS and Human Retrovirology.* 1999; 20: 342-9.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper-JR N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 2143-7.

- Vaidian AK, Weiss LM, Tanowitz HB. Chagas' disease and AIDS. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2004; 3: 2.
- Virreira M, Truyens C, Alonso-Vega C, Brutus L, Jijena J, Torrico F, Carlier Y, Svoboda M. Comparison of *Trypanosoma cruzi* and Lineages and Levels of Parasitic DNA Infected Mothers and Their Newborns. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77: 102-6.
- Wendel-Neto S. Risco Residual da transmissão da infecção por *Trypanosoma cruzi* por via transfusional no Brasil. Tese de Doutorado. São Paulo. Faculdade de Medicina USP; 2005.
- Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, Breniere SF. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area: *FEMS Microbiol Letters.* 1994a; 124: 419-24.
- Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 1994b; 51: 771-7.
- Wincker P, Telleria J, Bosseno MF, Cardoso MA, Marques P, Yaksic N, Aznar C, Liegeard P, Hontebeyrie M, Noireau F, Morel CM, Breniere SF. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitol.* 1997; 114: 367-73.

Yoo TW, Mlikotic A, Cornford ME, Beck CK. Concurrent cerebral american trypanosomiasis and toxoplasmosis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 30-4.

ANEXO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Instruções para preenchimento no verso)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO.....N.....APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:....
BAIRRO:.....CIDADE:
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Caracterização molecular de *Trypanosoma cruzi* isolados de pacientes com doença de Chagas e co-infecção HIV-*Trypanosoma cruzi*. Nível de parasitemia por técnicas parasitológicas e moleculares”, emenda do Termo de Consentimento anterior.

2. PESQUISADOR: Profa Maria Aparecida Shikanai Yasuda
CARGO/FUNÇÃO: Profa Titular INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N: 14500
UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO X RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA :

**III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE
OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA
CONSIGNANDO:**

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa.
Os pacientes com doença de Chagas têm um micróbio que se chama *Trypanosoma cruzi*. Esta pesquisa quer contar e estudar o DNA dos micróbios que tem em pacientes com doença de Chagas crônica, em pacientes que tem doença de Chagas e HIV ou em pacientes que estão na fila para transplante ou já fizeram transplante de algum órgão sólido (como rim, coração, fígado) ou medula óssea. Será utilizado um novo exame e queremos comprovar se realmente ele é bom, para isso precisamos testar em amostras de sangue ou líquido que já temos guardadas em nosso laboratório, porque elas tinham sido coletadas para fazer exames de rotina ou eram de outros projetos. Gostaríamos de pedir sua aprovação para que possamos utilizar estas amostras e seus resultados, que poderão ser úteis para monitorar a quantidade de micróbios no paciente que está grave, ajudar a descobrir se o tratamento está funcionando, e estudando o micróbio poderemos descobrir porque eles causam sintomas diferentes nos pacientes com doença de Chagas.
 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais
O material (sangue, líquido) já foi coletado e está armazenado, é necessário procurar o DNA do micróbio no sangue ou líquido, fazer a contagem e estudar as diferenças deste DNA.
 3. Desconfortos e riscos esperados
A sua participação neste estudo requer autorização para utilização dos resultados obtidos de amostra de material que já está coletado.
 4. Benefícios que poderão ser obtidos
Contando o número de micróbios podemos acompanhar, principalmente em pacientes graves se o número de micróbios está aumentando, se há necessidade do tratamento e se o tratamento está funcionando. Estudando as diferenças do DNA pode ajudar a descobrir porque uns pacientes apresentam formas mais graves do que os outros.
 5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo-
Não se aplica
-

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
O paciente poderá contactar, a qualquer momento, a Dra. Maria Aparecida Shikanai Yasuda, tel. 3061-7047 ou 3069-6530 para esclarecer dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
O paciente tem liberdade de retirar seu consentimento e deixar de participar do estudo sem prejuízo à assistência à saúde;
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
São garantidos a confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
A assistência será garantida no HCFMUSP se houver danos à saúde decorrentes da pesquisa
5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de .

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)