

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA FLÁVIA DE ARRUDA PIOVESANI

Comparação entre hemocultura, PCR da hemocultura e PCR do sangue para
detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes na fase crônica da infecção

Maringá

2015

ANA FLÁVIA DE ARRUDA PIOVESANI

Comparação entre hemocultura, PCR da hemocultura e PCR do sangue para detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes na fase crônica da infecção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Profa. Dra. Mônica Lúcia Gomes.

Maringá

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

P662c Piovesani, Ana Flávia de Arruda
Comparação entre hemocultura, PCR da hemocultura e PCR do sangue para detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes na fase crônica da infecção / Ana Flávia de Arruda Piovesani. -- Maringá, 2015.
39 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mônica Lúcia Gomes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.

1. Doença de Chagas - Diagnóstico. 2. PCR da hemocultura. 3. PCR do sangue. I. Gomes, Mônica Lúcia, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 21.ed. 616.9363

MN-001991

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA FLÁVIA DE ARRUDA PIOVESANI

Comparação entre hemocultura, PCR da hemocultura e PCR do sangue para detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes na fase crônica da infecção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Mônica Lúcia Gomes

Universidade Estadual de Maringá (Orientadora)

Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo

Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Márcia Machado de Oliveira Dalalio

Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 25 de Março de 2015.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, minha família e meu namorado pelo apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela graça da vida e inúmeras bênçãos derramadas sobre mim e toda minha família. Por seu amor e misericórdia.

Agradeço à minha orientadora, prof^a. Dr^a. Mônica Lúcia Gomes por me proporcionar um imenso aprendizado mesmo em tão pouco tempo, pela dedicação e competência, a qual aprendi a admirar como profissional e mulher. Obrigada por ter me dado a oportunidade de ser sua aluna.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, à todos os professores, funcionários e colegas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À doutora Divina S. O. Marques do Hospital Universitário de Londrina e a todos os pacientes que foram solidários em participar deste estudo, sem os quais este trabalho não seria possível. Muito obrigada por acreditarem na importância da pesquisa científica.

À minha mãe Luzia Mara Vilasboas de Arruda pelo amor incondicional, apoio e incentivo nos momentos de dificuldade. Pela intensidade com que sempre confiou em mim e pela garra que sempre superou as dificuldades. Você é meu exemplo!

Ao meu pai José Vagner Piovesani pelo seu amor, cuidado e apoio fundamental, especialmente durante a faculdade. Por entender minhas decisões e me ajudar muito além das possibilidades.

Ao meu namorado Gustavo Viais por me suportar nos momentos de cansaço e pelo amor e carinho com que sempre me incentivou a seguir em frente. Por viver comigo muitos dos meus sonhos e me ajudar a alcançá-los.

À toda minha família, meus irmãos Gustavo e Geanluca, meu padrasto Ideraldo, avós, primos e tios que acreditam muito mais no meu potencial do que eu mesma jamais acreditarei.

Às minhas amigas Carla, Renata, Ariella, Cris, Franciele, Elisama e todas as alunas da Parasitologia Básica da UEM, pelos anos de convivência, amizade e trocas de experiências que me fizeram crescer muito todo esse tempo.

À minha amiga Angélica, por ter me proporcionado a chance de aprender, pela paciência em ensinar e por confiar plenamente no meu trabalho e capacidade. Muito obrigada!

Aos funcionários e professores da Parasitologia Básica, sempre prontos a ajudar e a acolher todos com muito carinho e consideração.

À Lena, Michele, Suze, Jaiene, Rodriane e Daiane pelos anos de convivência, companheirismo e conversas sempre muito produtivas. Guardarei cada uma de vocês no meu coração como parte fundamental desta conquista.

EPÍGRAFE

A experiência nunca falha,
apenas as nossas opiniões falham,
ao esperar da experiência aquilo
que ela não é capaz de oferecer.
(LEONARDO DA VINCI)

Comparação entre hemocultura, PCR da hemocultura e PCR do sangue para detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes na fase crônica da infecção

RESUMO

Para o diagnóstico da doença de Chagas, a hemocultura é um método parasitológico com alta especificidade mas baixa sensibilidade e a PCR é um método molecular mais sensível. Com o intuito de associar a especificidade da hemocultura e a sensibilidade da PCR, foi proposto realizar a PCR a partir de amostras obtidas da hemocultura (PCR-HC) de 79 pacientes na fase crônica da infecção. Além da PCR-HC, foram realizados os métodos de hemocultura e da PCR do sangue (PCR-SG). Para a hemocultura foram utilizados 30 mL de sangue e para a PCR-HC e PCR-SG, 2,4 mL do sedimento da hemocultura e 10 mL de sangue foram adicionados à igual volume de Guanidina-EDTA, respectivamente. O DNA foi extraído de cada amostra e o fragmento de 330 pares de base do minicírculo de *Trypanosoma cruzi* foi amplificado. A PCR-HC ($p=0,00005$) e a PCR-SG ($p=0,00121$) apresentaram positividade significativamente maior que a da hemocultura. A positividade da PCR-HC também foi significativamente maior ($p=0,00032$) que a da PCR-SG. Conclui-se que a positividade da PCR-HC é maior que da PCR-SG e do que da hemocultura, podendo constituir um método alternativo válido para aumentar a detecção do parasito, melhorando o diagnóstico parasitológico e a identificação de falha terapêutica.

Palavras-chave: Diagnóstico, Doença de Chagas, PCR do sangue, PCR da hemocultura, Hemocultura.

Comparison between hemoculture, PCR of hemoculture and PCR of blood for detection of *Trypanosoma cruzi* in patients in the chronic phase of infection

ABSTRACT

For Chagas disease diagnosis, the hemoculture is a parasitological method with high specificity but with low sensitivity and the PCR is a more sensitive molecular method. In order to combine the specificity of the hemoculture and sensitivity of the PCR, we have proposed to perform the PCR from samples obtained from the hemoculture (PCR-HC) of 79 patients in the chronic phase of infection. In addition to the PCR-HC, the methods of hemoculture and PCR of blood (PCR-BL) were performed. To carry out the hemoculture, 30 mL of blood were used and to the PCR-HC and PCR-SG, 2.4 mL of sediment of the hemoculture and 10 mL of blood was added to an equal volume of Guanidine-EDTA, respectively. The DNA was extracted of each sample and the fragment of 330 base pair from *Trypanosoma cruzi* minicircle was amplified. The PCR-HC ($p=0.00005$) and the PCR-BL ($p=0.00121$) were significantly more positive than the hemoculture. The positivity of the PCR-HC was also significantly higher ($p=0.00032$) than the PCR-BL. We have concluded that the positivity of the PCR-HC is greater than PCR-BL and hemoculture, which may constitute a valid alternative method to increase the detection of the parasite, improving the parasitological diagnosis and identification of treatment failure.

Keywords: Diagnosis, Chagas disease, PCR of blood, PCR of hemoculture, hemoculture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Figure 1 Positivity of the hemoculture (HC), PCR of hemoculture (PCR-HC) and PCR of blood (PCR-BL) in patients infected with <i>Trypanosoma cruzi</i> (n=79).....	35
Table 1 Comparison of the hemoculture results with the PCR of hemoculture (PCR-HC) and the PCR of blood (PCR-BL) in patients infected with <i>Trypanosoma cruzi</i> (n=79).....	36
Table 2 Comparison of the PCR of hemoculture (PCR-HC) with the PCR of blood (PCR-BL) in samples from patients infected with <i>Trypanosoma cruzi</i> (n=79).....	37

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): *International Journal of Infectious Diseases* (short communication 1 – 5 Year Impact Factor: 2.417 – B1) disponível em: <<http://www.ijidonline.com/>>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.1 Ciclo Biológico	13
1.2 Vetores	14
1.3 Epidemiologia	15
2. Doença de Chagas	16
2.1 Histórico	17
2.2 Diagnóstico	18
2.3 Tratamento	19
2.4 Prevenção e Controle	20
3. Justificativa	21
4. Objetivos	21
5. Referências	22
CAPÍTULO II	29
1. Short Communication	29
CAPÍTULO III	38
1. Conclusão	38
2. Perspectivas futuras	39

CAPÍTULO I

1. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário parasita pertencente a ordem Kinetoplastida, capaz de infectar mamíferos e ser transmitido por vários vetores invertebrados hematófagos. Esta característica permite com que o parasito causador da doença de Chagas circule pelos ciclos silvestre, doméstico e peridoméstico, e se distribua amplamente, especialmente na América Latina (ARAÚJO et al., 2010; ABOLIS et al., 2011).

O mais importante e conhecido mecanismo de transmissão do *T. cruzi* é pelo inseto vetor infectado. Os triatomíneos ou barbeiros se alimentam do sangue de mamíferos e após a picada depositam suas fezes/urina no hospedeiro. A infecção ocorre quando o *T. cruzi* presente nas fezes do barbeiro penetram na pele pelo local da picada ou regiões de mucosas e pele não íntegra próximas (IBÁÑES-CERVANTES et al., 2013; WHO, 2013).

Após significativos avanços no combate aos vetores transmissores da doença de Chagas, outras formas de transmissão tornaram-se relevantes, tais como: transmissão transfusional e transplantes de órgãos, transmissão congênita, acidentes de laboratório e transmissão oral. Esta última requer atenção especial, pois surtos de infecção oral pelo *T. cruzi* estão geralmente associados a um elevado número de pessoas infectadas e casos agudos graves da doença (ALVARADO-OTEGUI et al., 2012; WHO, 2013).

1.1 CICLO BIOLÓGICO

T. cruzi é um parasito heteroxênico que infecta hospedeiros vertebrados e invertebrados e apresenta diferentes formas evolutivas. No hospedeiro invertebrado, principal fonte de infecção humana, o ciclo inicia-se com a ingestão de sangue contaminado com a forma tripomastigota sanguínea de um hospedeiro vertebrado. Após a ingestão, o tripomastigota sanguíneo se transforma em epimastigota no segmento posterior do intestino médio. Nesta etapa a multiplicação ocorre ativamente por fissão binária simples. No intestino posterior a forma epimastigota se transforma em tripomastigota metacíclico, forma infectante para hospedeiros vertebrados, que é eliminada nas fezes após o repasto sanguíneo (TYLER e ENGMAN, 2001; NEVES, 2011).

No hospedeiro vertebrado o ciclo se inicia com a penetração da forma tripomastigota metacíclica, eliminada nas fezes do vetor (hospedeiro invertebrado), pela pele lesada ou mucosas. Estas formas infectantes invadem as células do sistema fagocítico-mononuclear e se diferenciam em amastigotas. Amastigota é a forma de multiplicação intracelular no

hospedeiro vertebrado. Após o processo de multiplicação, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas. Estes rompem as células infectadas, caem na circulação sanguínea e podem infectar novas células do hospedeiro vertebrado ou invertebrado, caso ocorra o repasto sanguíneo. Assim o ciclo se inicia novamente (TYLER e ENGMAN, 2001; YOSHIDA, 2006).

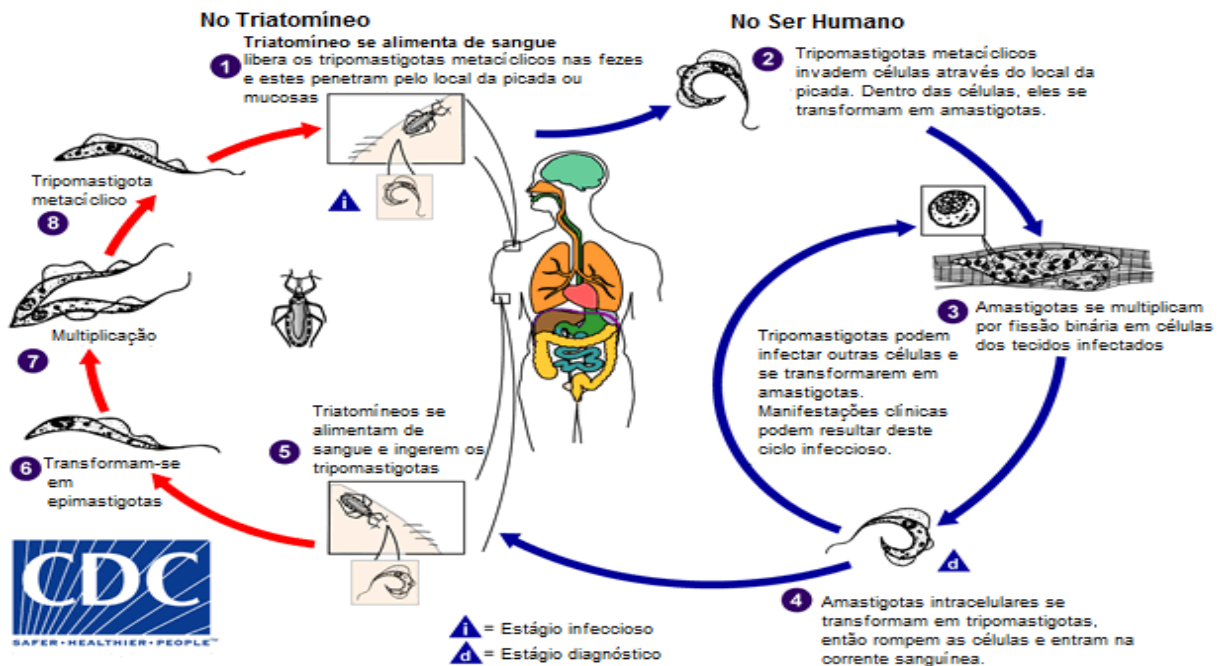


Figura 1: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/>

1.2 VETORES

Os triatomíneos, membros da família Reduviidae da ordem Hemiptera, são os vetores do *T. cruzi*. No Brasil já foram catalogadas 138 espécies, das quais cinco desempenham um papel direto na epidemiologia da doença de Chagas: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasilienses*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida* (GALVÃO et al., 2003; FORATTINI, 2006; SCHMUNIS e YADON, 2010).

T. infestans é considerado o vetor mais importante envolvido na transmissão da doença de Chagas no Brasil e países do Cone Sul, pois frequentemente é encontrado em habitações humanas e é altamente antropofílico (FORATTINI, 2006). *T. sordida* é nativo do cerrado brasileiro e apesar de seu notável tropismo para aves, pode invadir habitações humanas quando seu habitat é perturbado ou quando a alimentação torna-se escassa. É a

segunda espécie mais associada com a transmissão da doença de Chagas no Brasil. *T. brasiliensis* e *P. megistus* são raramente encontrados em áreas domiciliares e peridomiciliares, porém são capazes de manter o ciclo de transmissão entre as populações rurais (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010). Nos estados da região nordeste (exceto na Bahia), a alta concentração de *T. brasiliensis* tem dificultado o controle de vetores na região, que pode se tornar um problema futuro devido a facilidade com que esse parasito se mantém no meio rural (BRITO et al., 2012, MARTINS-MELO et al., 2012). *T. rubrovaria* também tem demonstrado capacidade de assumir os nichos de *T. infestans* no sul do Brasil e estabelecer ciclos peridomésticos, especialmente no Rio Grande do Sul (MARTINS et al., 2008).

Nos Estados Unidos, *Triatoma sanguisuga* foi identificado como o vetor mais provavelmente relacionado com infecção humana, bem como outras espécies: *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma lecticularia* e *Triatoma indicativa*. Nos países andinos e da América Central, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são os principais vetores domiciliados, assim como o *Triatoma barberi* no México (CESA et al., 2011).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo e cerca de 10.000 pessoas morrem a cada ano, devido às manifestações clínicas da doença de Chagas (OPS, 2006; WHO, 2013). Apesar de ocorrer em maiores proporções na América Latina, com quase 6 milhões de indivíduos infectados, nas últimas décadas esta doença tem sido detectada nos Estados Unidos da América, Canadá e muitos países do Pacífico e Europa Ocidental, especialmente na Espanha. Isto tem ocorrido devido a presença de imigrantes latino-americanos infectados pelo *T. cruzi*, tornando a doença um problema de saúde emergente em áreas não-endêmicas (SCHMUNIS e YADON et al., 2010; BERN et al., 2011; GARCIA et al., 2014; WHO, 2015).

De 1990 a 2006 o número anual de novos casos de transmissão vetorial reduziu de 700.000 para 41.200 e o número de mortes reduziu de cerca de 50.000 por ano em 1990 para 12.500 em 2006. A taxa de transmissão pelo *T. cruzi* varia muito de acordo com a região pesquisada e a forma de transmissão avaliada. Na Argentina a taxa de transmissão congênita é de 2,4%, enquanto no Paraguai este índice chega a 18,2% (MONCAYO e SILVEIRA, 2009; CARLIER e TRUYENS, 2010). A Bolívia é considerada o país mais afetado com taxa global de infecção de 28,8%, podendo alcançar até 45% em algumas áreas (MURCIA et al., 2013). Pesquisas estimam que o número total de indivíduos infectados com *T. cruzi* vivendo nos

Estados Unidos é superior a 300.000 e na Europa acima de 80.000 (WHO, 2009; KIRCHHOF, 2011). No México a incidência da doença de Chagas é de cerca de 69.000 casos, com 5-6% de mortes (RAMSEY et al., 2003).

No Brasil, após a implantação de medidas de controle de transmissão vetorial e transfusional, houve uma drástica redução no número de novos casos. Estima-se que mais de um milhão de pessoas estão infectadas, com mais de 25 milhões sob risco de infecção e cerca de seis mil casos fatais por ano. Acredita-se que esta taxa de mortalidade por doença de Chagas no Brasil é subestimada, devido à falta de informações contidas nas declarações de óbito (MARTINS-MELO et al., 2012; WHO, 2015).

Grandes avanços têm ocorrido no controle da transmissão vetorial e transfusional, que resultaram na redução da transmissão vetor-humano e humano-humano no Uruguai, Chile e Brasil. No entanto, casos de transmissão oral, antes considerados esporádicos, tem se tornado frequentes e hoje representam uma importante via de transmissão, responsável pelo aumento da morbi-mortalidade da forma aguda da doença de Chagas (BRASIL, 2008). Deste modo, ainda é necessário a consolidação de políticas públicas de promoção à saúde e prevenção da doença para se alcançar a eliminação total da transmissão do *T. cruzi* (KIRCHHOF, 2011; BRITO et al., 2012).

2. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, causada pelo protozoário parasito *T. cruzi*, está entre as doenças tropicais mais negligenciadas do mundo, especialmente nos 21 países da América Latina, onde é endêmica (WHO, 2013).

Esta doença, embora apresente uma evolução essencialmente crônica, resultante de uma longa associação entre o hospedeiro e o parasito, pode apresentar uma fase aguda que dura em média 4-8 semanas após a infecção (ZINGALES et al., 2012; COURA, 2013). Nessa fase a parasitemia é elevada e os títulos de anticorpos são baixos, sendo que a maioria dos indivíduos infectados é assintomática, com 1-2% deles podendo apresentar febre, dores de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço e dores abdominais (WHO, 2015). Em raros casos, pode ocorrer miocardite grave, que é a causa mais frequente de morte durante a fase aguda, especialmente em crianças. Nos casos de transmissão vetorial, sinais de porta de entrada (chagoma de inoculação e sinal de Romaña) podem estar presentes (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010).

Na fase crônica, a parasitemia é mais baixa, embora intermitente e os níveis de anticorpos são elevados. O parasitismo tecidual é mais intenso, quando comparado à parasitemia, principalmente no músculo cardíaco e digestivo (SCHIJMAN et al., 2004; WHO, 2015). Nessa fase os pacientes geralmente são assintomáticos, estando na forma indeterminada da doença, sem apresentarem alterações nos principais órgãos acometidos (coração, esôfago ou cólon), mas com testes sorológicos, parasitológicos e moleculares repetidamente positivos por anos (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010, 2011). As manifestações clínicas geralmente aparecem entre 10 a 30 anos após a infecção inicial, 30% dos pacientes apresentam alterações cardíacas, principalmente cardiomegalia e 10% digestivas (mega-cólon e mega-esôfago) ou ambas, correspondendo às formas cardíaca, digestiva e cardiodigestiva, respectivamente (KÖBERLE , 1961;Coura, 2007; RASSI et al., 2010; WHO, 2015).

2.1 HISTÓRICO

A descoberta da doença de Chagas representa um dos mais importantes sucessos da história da biologia parasitária. Um único pesquisador foi responsável pela descoberta de um novo parasito, seu vetor, animais suscetíveis à infecção, a doença aguda e crônica e os ciclos domésticos e silvestres (KROPF e SÁ, 2009; COURA e BORGES-PEREIRA, 2010). Em 1908, o Dr. Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, diretor do Instituto Oswaldo Cruz, encontrou uma espécie de *Trypanosoma* no sangue de um sagui (*Callithrix penicillata*). No mesmo ano, ele próprio examinou uma espécie de inseto hematófago comum na região de Lassance em Minas Gerais, conhecido como barbeiro (*Panstrongylus megistus*) e identificou a forma epimastigota deste *Trypanosoma* (COURA, 2013). Amostras dos insetos infectados foram enviadas ao Rio de Janeiro para o Dr. Oswaldo Cruz e ambos concluíram tratar-se de uma nova espécie de *Trypanosoma*, capaz de infectar cobaias como cães, coelhos e gatos. A esta nova espécie foi dada o nome de *Trypanosoma cruzi*. Em 1909, foi descoberto o primeiro caso humano da doença de Chagas: Berenice, dois anos de idade, morava em uma casa infestada por *P. megistus* e apresentava sintomas de fase aguda. Manteve-se doente por oito dias e após uma semana ainda apresentava *T. cruzi* no sangue periférico (KROPF e SÁ, 2009).

A doença de Chagas mantém-se como uma enzootia de animais silvestres a milhares de anos, mas devido ao desmatamento das áreas florestais pela ação humana, os triatomíneos (vetores em potencial de *T. cruzi*) começaram a colonizar áreas próximas a residências e a se alimentar do sangue de seres humanos e animais domésticos. Estes animais atuam como

importantes reservatórios na epidemiologia da doença de Chagas, juntamente com gambás, tatus e roedores (DEAENE et al., 1984; COURA e DIAS, 2009).

2.2 DIAGNÓSTICO

A Organização Mundial de Saúde recomenda para o diagnóstico da doença de Chagas a utilização de pelo menos dois métodos sorológicos, de diferentes princípios e antígenos (WHO, 2013). Os mais amplamente utilizados são os métodos de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e IFI (Imunofluorescência Indireta). Estes métodos são utilizados em função da alta sensibilidade e especificidade (95% e 93-98%, respectivamente), porém é possível ocorrer reações cruzadas com outros parasitos da ordem *Kinetoplastida* (*Leishmania spp.* e *T. rangeli*) (GILBER et al., 2013). Para pacientes com sorologia duvidosa e durante a fase aguda, período em que os títulos de anticorpos ainda são baixos, é aconselhável associar os métodos sorológicos com os parasitológicos e moleculares para confirmar o diagnóstico de infecções pelo *T. cruzi* (CASTRO et al., 2002; KINOSHITA-YANAGA et al., 2011).

Os métodos parasitológicos mais utilizados são o exame de sangue a fresco, hemocultura e xenodiagnóstico, que são altamente específicos, mas com sensibilidade variável (CASTRO et al., 2002). No exame de sangue a fresco pela microscopia direta distingui-se facilmente o parasito e suas características morfológicas. Porém, a sua baixa sensibilidade torna-o pouco útil na fase crônica da infecção (MURCIA et al., 2013). O xenodiagnóstico, método que utiliza vetores biológicos de *T. cruzi*, é sabidamente pouco sensível (CASTRO et al., 2002; SCHIJMAN et al., 2011), mas quando associado ao método molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) realizada em amostras fecais dos vetores tem apresentado melhor sensibilidade (MARCET et al., 2006, PIZARRO et al., 2007; BRAVO et al., 2012). A hemocultura, método que promove multiplicação do parasito por enriquecimento da amostra, apresenta sensibilidade variável, especialmente em pacientes na fase crônica, período em que a parasitemia é baixa (CASTRO et al., 2002; FERRER et al., 2012). Tais métodos parasitológicos são laboriosos, demandam mais tempo para processamento e leitura e por isso são pouco utilizados em rotinas laboratoriais (SCHIJMAN et al., 2011; DUFFY et al., 2013; GILBER et al., 2013).

A PCR é um método molecular que visa a amplificação de fragmentos de DNA de qualquer microrganismo. Este método começou a ser utilizado para o diagnóstico de infecções pelo *T. cruzi* no ano de 1989, como alternativa aos métodos parasitológicos, sabidamente menos sensíveis e mais demorados. Envolve princípios de multiplicação similares ao

xenodiagnóstico e hemocultura, no entanto ao invés do parasito, apenas fragmentos do DNA do mesmo são multiplicados (amplificados), aumentando a sensibilidade (STURM et al., 1989). Para a detecção de *T. cruzi* costuma apresentar boa concordância com os resultados dos métodos sorológicos, porém sua sensibilidade pode variar de acordo com: a região do DNA a ser analisada, a unidade de tipagem distinta (DTU) do parasito, volume de sangue coletado, presença de inibidores, protocolos de extração, dentre outros (CASTRO et al., 2002; RAMIREZ et al., 2009; KINOSHITA-YANAGA et al., 2011). A PCR é um método especialmente útil para confirmar casos de sorologia duvidosa, acompanhar pacientes pós-tratamento, diagnosticar precocemente a reativação pós transplantes e terapias imunossupressoras, bem como detectar a presença do *T. cruzi* em triatomíneos utilizados para xenodiagnóstico (PIZARRO et al., 2007; RAMIREZ et al., 2009; SCHIJMAN et al., 2011).

2.3 TRATAMENTO

O tratamento quimioterápico da doença de Chagas deve ser imediatamente indicado em todos os casos agudos confirmados independentemente do modo de infecção, bem como em pacientes na fase crônica recente, em menores de 18 anos ou aqueles em que a infecção foi reativada. O tratamento dos pacientes de fase crônica tardia com idade superior a 19 anos fica a critério do médico e do próprio paciente, pois os benefícios devem ser calculados considerando a longa duração (até dois meses) e possíveis reações adversas, que ocorrem em até 40% dos pacientes (COURA e BORGES-PEREIRA, 2011; MURCIA et al., 2013; WHO, 2013). No entanto, o tratamento de adultos na fase crônica intermediária ou com cardiopatia leve pode evitar ou atenuar possíveis danos cardíacos letais (CANÇADO, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; JACKSON et al., 2013). Gestantes, pacientes com insuficiência renal ou hepática, com distúrbios neurológicos ou psiquiátricos, não devem ser tratados com quimioterápicos (SOSA-ESTANI et al., 2009; WHO, 2013).

Os quimioterápicos atuais utilizados para o tratamento etiológico da doença de Chagas são mais eficazes na fase recente da infecção, período em que a parasitemia é elevada. Quanto maior a demora em iniciar o tratamento, menor a eficácia dos quimioterápicos (URBINA e DOCAMPO, 2003; WHO, 2013). Diferentes grupos de substâncias têm sido utilizados experimentalmente para eliminar a infecção por *T. cruzi*, porém apenas dois medicamentos são considerados eficazes: nifurtimox e benznidazol. Nos países da América Latina, o benznidazol é o medicamento de escolha, e é o único autorizado na Espanha. Tanto o benznidazol como o nifurtimox possuem efeitos colaterais importantes, que resultam em altos índices de abandono de tratamento, especialmente em adultos (COURA e BORGES-

PEREIRA, 2011; JACKSON et al., 2013; MURCIA et al., 2013). Entre os efeitos colaterais mais comuns relatados pelos pacientes estão a neuropatia periférica, reações cutâneas, granulocitopenia, dor abdominal, anorexia, vômito, inquietude, desorientação, espasmos e convulsões (MURCIA et al., 2013).

O tratamento de distúrbios cardíacos na doença de Chagas é semelhante ao de cardiopatias de diversas etiologias. Pode ser necessário o uso de diuréticos, inibidores da angiotensina, beta-bloqueadores, anticoagulantes e antiarrítmicos e em alguns casos intervenções cirúrgicas como o transplante cardíaco ou implantação de marcapasso. Nos distúrbios digestivos o tratamento consiste em reduzir os sintomas, pois não existem fármacos capazes de evitar a progressão da doença. O megaesôfago pode responder a nitratos, dilatação com balão ou miotomia. O único tratamento para o megacólon chagásico é a intervenção cirúrgica (MURCIA et al., 2013). Medidas alternativas como a atividade física e uso de medicamentos ultradiluídos têm sido estudadas com o intuito de estimular a resposta do organismo à infecção e reduzir a parasitemia, com consequente melhoria da qualidade de vida de pacientes chagásicos crônicos (LEÃO et al., 2011; ALEIXO et al., 2012; FIALHO et al., 2012).

Após o tratamento, o critério de cura estabelecido é a conversão dos métodos sorológicos em resultados negativos, que geralmente ocorre anos após o término do tratamento etiológico. Neste período, os métodos parasitológicos e moleculares, como a PCR e hemocultura, podem ser uma alternativa válida para indicar falha terapêutica e mostrar a evolução da resposta ao medicamento nos indivíduos infectados (WHO, 2002).

2.4 PREVENÇÃO E CONTROLE

Historicamente, *T. cruzi* infectava somente animais silvestres (enzootia florestal), afetando mais tarde os humanos e animais domésticos (antropozoonose), principalmente devido a ocupação de áreas florestais. Isto significa que o parasito está amplamente distribuído em reservatórios animais na natureza e por este motivo não pode ser erradicado. Sendo assim, as medidas de controle da doença de Chagas englobam a eliminação da transmissão e ampliação do acesso aos cuidados de saúde à população infectada e doente (COMINETTI et al., 2011; WHO, 2013). A eliminação do vetor e as medidas preventivas pessoais são recomendadas para evitar a infecção pelo *T. cruzi*, tais como pulverização de casas, práticas de higiene na preparação de alimentos, triagem dos doadores de sangue e órgãos, recém nascidos e crianças de mães infectadas, bem como melhorias no diagnóstico e

acesso ao tratamento (SCHMUNIS e YADON, 2010; MARTINS-MELO et al., 2012;WHO, 2013).

Apesar dos significativos avanços que têm ocorrido no controle da transmissão vetorial e transfusional nos países do Cone Sul (especialmente Brasil, Chile e Uruguai), a doença de Chagas continua sendo de baixa prioridade, especialmente por ser de evolução clínica lenta e baixa repercussão social. Ainda são necessários maiores investimentos em medidas preventivas e educacionais, bem como melhorias no diagnóstico e acesso ao tratamento (WHO, 2002; SCHOFIELD et al., 2006; DIAS, 2007).

3. JUSTIFICATIVA

A hemocultura está entre os principais métodos laboratoriais de detecção de *T. cruzi*, principalmente na fase crônica da infecção. Este método parasitológico é 100% específico, mas com sensibilidade variando de 10,4 a 90% (LUZ et al., 1993; FERNANDES et al., 1999; GILBER et al., 2013). Outro método que também detecta a presença do parasito em hospedeiros infectados é a PCR, que apresenta maior sensibilidade (entre 76,4 e 100%) em relação aos métodos parasitológicos, e é útil em casos de pacientes com baixa parasitemia e no acompanhamento pós-tratamento (GOMES et al., 1999; STEINDEL et al., 2008; GILBER et al., 2013). Neste contexto, a associação da alta especificidade da hemocultura com a alta sensibilidade da PCR poderia promover melhoras no diagnóstico e acompanhamento de pacientes, especialmente na fase crônica da doença de Chagas. Com base nisso, foi proposto nesse trabalho aumentar a capacidade de detecção do *T. cruzi* realizando a PCR em amostras obtidas de hemocultura de pacientes com doença de Chagas crônica e comparar esses resultados com os obtidos para cada método isolado, PCR diretamente do sangue e da hemocultura.

4. OBJETIVOS

GERAL

Aumentar a capacidade de detecção de *T. cruzi* realizando a PCR convencional em amostras obtidas de hemocultura de pacientes com doença de Chagas crônica.

Específicos

Determinar a positividade da hemocultura (HC) em pacientes na fase crônica da doença de Chagas;

Detectar a presença de *T. cruzi* realizando a PCR em amostras obtidas a partir da hemocultura (PCR-HC) de pacientes na fase crônica da doença de Chagas;

Detectar a presença de *T. cruzi* realizando a PCR no sangue (PCR-SG) de pacientes na fase crônica da doença de Chagas;

Comparar os resultados da PCR-HC com aqueles obtidos pela PCR-SG e HC;

Comparar os resultados da PCR-SG com os resultados da HC.

5. REFERÊNCIAS

ABOLIS, N.G.; ARAÚJO, S.M.; TOLEDO, M.J.O.; FERNANDEZ, M.A.; GOMES, M.L. *Trypanosoma cruzi* I–III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. **Acta Tropica**, v. 120, p. 167-172, 2011.

ALEIXO, D.L.; FERRAZ, F.N.; FERREIRA, E.C.; LANA, M.; GOMES, M.L.; FILHO, B.A.A.; ARAÚJO, S.M. Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. **BMC Research Notes**, v. 5, p. 352-360, 2012.

ALVARADO-OTEGUI, J.A.; CEBALLOS, L.A.; OROZCO, M.M.; ENRIQUEZ, G.F.; CARDINAL, M.V.; CURA, C.; SCHIJMAN, A.G.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.E. The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina. **Acta Tropica**, v. 124(1), p. 79-86, 2012.

ARAÚJO, C.A.C.; WANIEK, P.J.; XAVIER, S.C.C.; JANSEN, A.M. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 308-312, 2010.

BERN C, KJOS S, YABSLEY MJ, MONTGOMERY SP: *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 655-681, 2011.

BRASIL, P.E.A.A.; CASTRO, L.; HASSLOCHER-MORENO, A.M.; SANGENIS, L.H.C.; BRAGA, J.U. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p.337-353, 2010.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 35, de 19 de junho de 2008 – Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão da Doença de Chagas Aguda por Alimentos. Disponível em:http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/alimentos!/ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B_A3cvA_2CbEdFADQgSKI!/?1dmy&urile=wcm%3Apath%3A/anvisa+portal/anvisa/inicio/alimentos/publicacao+alimentos/informes+alimentos/2008-06-19-35 Acesso em: 27/03/2015.

BRAVO, N.; MUÑOZ, C.; NAZAL, N.; SAAVEDRA, N.; MARTÍNEZ, G.; ARAYA, E.; APT, W.; ZULANTAY, I. Real-Time PCR in faecal samples of *Triatoma infestans* obtained by xenodiagnosis: proposal for an axogenous internal control. **Parasites and Vectors**, v. 5, p. 59-62, 2012.

BRITO, C.R.N.; SAMPAIO, G.H.F.; CÂMARA, A.C.J.; NUNES, D.F.; AZEVEDO, P.R.M.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.C. Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection in the semiarid rural zone of the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(3), p. 346-352, 2012.

CALDAS, S.; CALDAS, I.S.; DINIZ, L.F.; LIMA, W.G.; OLIVEIRA, R.P.; CECÍLIO, A.B.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BAHIA, M.T. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Acta Tropica**, v. 123, p. 170-177, 2012.

CANÇADO, J.B. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with Benznidazole. **Revista do Instituto Brasileiro de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44(1), p. 29-37, 2002.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*, one hundred years of research. American Trypanosomiasis Chagas disease. **Elsevier UK**, p. 539–81, 2010.

CASTRO, A.M.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A.; RASSI, G.G.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.C. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 88, p. 894-900, 2002.

CESA, K.; CAILLOUËT, K. A.; DORN, P. L.; WESSON, D. M. High *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Prevalence in *Triatoma sanguisuga* (Hemiptera: Reduviidae) in Southeastern Louisiana. **Journal of Medical Entomology**, v. 48(5), p. 1091-1094, 2011.

COMINETTI, M.C.; ANDREOTTI, R.; OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E.M.C. Epidemiological factors related to the transmission risk of *Trypanosoma cruzi* in a Quilombola community, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44(5), p. 576-581, 2011.

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

COURA, J.R. The discovery of Chagas disease (1908-1909): Great successes and certain misunderstandings and challenges. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46(4), p. 389-390, 2013.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, p. 5-13, 2010.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106(6), p. 641-645, 2011.

COURA, J.R.; DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104(1), p. 31-40, 2009.

DEAENE, M.P.; LENZI, H.L.; JANSEN, A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79(4), p. 513-515, 1984.

DIAS JCP. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23 (supl I), p. 13-22, 2007.

DUFFY, T.; CURA, C.I.; RAMIREZ, J.C.; ABATE, T.; CAYO, N.M.; PARRADO, R.; BELLO, Z.D.; VELAZQUEZ, E.; MUÑOZ-CALDERON, A.; JUIZ, N.A.; BASILE, J.; GARCIA, L.; RIARTE, A.; NASSER, J.R.; OCAMPO, S.B.; YADON, Z.E.; TORRICO, F.; NOYA, B.A.; RIBEIRO, I.; SCHIJMAN, A.G. Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7(1), 2013.

FERNANDES, C.D.; TIECHER, F.M.; FERNANDES, D.D.; HENRIQUES, N.M.P.; STEINDEL, M. High Rates of Positive Hemocultures in Children and Teenagers Seropositive for *Trypanosoma cruzi* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 (1), p. 7-8, 1999.

FERRER, E.; LARES, M.; VIETTRI, M.; MEDINA, M. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31(5), p. 277-282, 2012.

FIALHO, P.H.; TURA, B.R.; SOUSA, A.S.; OLIVEIRA, C.R.; SOARES, C.C.S.; OLIVEIRA, J.R.; SOUZA, M.V.; COELHO, M.P.; SOUZA, F.C.C.; CUNHA, A.B.; KOPIER, D.A. Effects of an exercise program on the functional capacity of patients with chronic Chagas' heart disease, evaluated by cardiopulmonary testing. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(2), p. 220-224, 2012.

FIGURA 1. Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/> (Acessado em: 20/06/2014).

FLEGONTOVA, O.; LUKES, J.; FLEGONTOV, P. Lack of evidence for integration of *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA in South American human genomes. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 437-441, 2012.

FORATTINI, O.P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 964-998, 2006.

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

GARCIA, M.N.; HOTEZ, P.J.; MURRAY, K.O. Potential novel risk factors for autochthonous and sylvatic transmission of human Chagas disease in the United States. **Parasites and Vector**, v. 7, p. 311-312, 2014.

GILBER, S.R.; ALBAN, S.M.; GOBOR, L.; BESCROVAINE, J.O.; MYIAZAKI, M.L.; THOMAZ-SOCCOL, V. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46(3), p. 310-315, 2013.

GOMES, M.L.; GALVAO, L.M.C.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J.; CHIARI, E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. **The American Journal of Tropical Medical and Hygiene**, v. 60 (2), p. 205–210, 1999.

IBÁÑEZ-CERVANTES, G.; MARTÍNEZ-IBARRA, A.; NOGUEDA-TORRES, B.; LÓPEZ-ORDUÑA, E.; ALONSO, A.L.; PEREA, C.; MALDONADO, T.; HERNÁNDEZ, J.M.; LEÓN-AVILA, G. Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut sample in México. **Parasitology International**, v. 62, p. 36-43, 2013.

JACKSON, Y.; CHATELAIN, E.; MAURIS, A.; HOLST, M.; MIAO, Q.; CHAPPUIS, F.; NDAO, M. Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after the nifurtimox treatment. **BMC Infectious Diseases**, v.13, p. 85-90, 2013.

KINOSHITA-YANAGA, A.T.; BÉRTOLI, M.; MARTINS, V.A.; MIZUTANI, A.S.; TOLEDO, M.G.O; ARAÚJO, S.M; GOMES, M.L. Polymerase chain reaction and blood culture in blood donors screened by ELISA test for Chagas' disease. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47(1), p. 53-61, 2011.

KIRCHHOFF, L.V. Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas disease). **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 1-18, 2011.

KOBERLE, F. Patologia y anatomia patológica de la enfermedad de Chagas. **Bol.Ofi. Sanit. Panamer.**,v. 51, p. 404-428, 1961.

KROPF, S.P.; SÁ, M.R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, Ciências, Saúde**, v. 16(1), p. 13-34, 2009.

LEÃO, E.P.; PENA, C.J.M.; ARAÚJO, S.M.; GOMES, M.L. Physical therapy combined with a laxative fruit drink for treatment of chagasic megacolon. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 48(1), p. 52-57, 2011.

LUZ, Z.M.P.; COUTINHO, M.G.; CANÇADO, J.R. Alta positividade de hemoculturas repetidas em pacientes chagásicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, p. 66-67, 1993.

MARCET, P.L.; DUFFY, T.; CARDINAL, M.V.; BURGOS, J.M.; LAURICELLA, M.A.; LEVIN, M.J.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.E.; SCHIJMAN, A.G. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. **Parasitology**, v. 132(1), p. 57-65, 2006.

MARTINS, L.P.A.; MARCILI, A.; CASTANHO, R.E.P.; THEREZO, A.L.S.; OLIVEIRA, J.C.P.; SUZUKI, R.B.; TEIXEIRA, M.M.G.; DA ROSA, J.A.; SPERANÇA, M.A. Rural *Triatoma rubrovaria* from Southern Brazil Harbors *Trypanosoma cruzi* of Lineage IIc. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79(3), p. 427-434, 2008.

MARTINS-MELO, F.R.; RAMOS JR, A.N.; ALENCAR, C.H.; HEUKELBACK, J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6(11), p. 817-824, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretária de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38(3), p. 1-29, 2005.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 (supl I), p.17-30, 2009.

MOREIRA, O.C.; RAMÍREZ, J.D.; VELÁZQUEZ, E.; MELO, M.F.A.D.; LIMA-FERREIRA, C.; GUHL, F.; SOSA-ESTANI, S.; MARIN-NETO, J.A.; MORILLO, C.A.; BRITTO, C. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. **Acta tropica**, v. 125, p. 23-31, 2013.

MURCIA, L.; CARRILERO, B.; SAURA, D.; IBORRA, M.A.; SEGOVIA, M. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31(1), p. 26-34, 2013.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana, 12 Ed., São Paulo, Editora Atheneu, 85 – 105, 2011.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. **OPS/HDM/CD/**, 425-06, 2006.

PIZARRO, J.C.; LUCERO, D.E.; STEVENS, L. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector, *Triatoma infestans*: High rates found in Chuquisaca, Bolivia. **BMC Infectious Disease**, v. 7, p. 66-73, 2007.

RAMÍREZ, J.D.; GUHL, F.; UMEZAWA, S.E.; MORILLO, C.A.; ROSAS, F.; MARIN-NETO, J.A.; RESTREPO, S. Evaluation of Adult Chronic Chagas' Heart Disease Diagnosis by Molecular and Serological Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47(12), p. 3945-3951, 2009.

RAMSEY, J.M.; ORDÓÑEZ, R.; TELLO-ÓPEZ, A. Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Iniciativa para la vigilancia y el control de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. **Instituto Nacional de Salud Pública**, p. 85–103, 2003.

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

Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. TDR/GTC/09. **Buenos Aires: Organización Mundial de la Salud**, 2005.

SCHIJMAN, A.G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; JARAMILLO, A.M.M; CURA, C.; AUTER, F.; VERON, V.; QVARNSTROM, Y.; DEBORGGRAEVE, S.; HIJAR, G.; ZULANTAY, I.; LUCERO, R.H.; VELAZQUEZ, E.; TELLEZ, T.; LEON, Z.S.; GALVÃO, L.; NOLDER, D.; RUMI, M.M.; LEVI, J.E.; RAMIREZ, J.D.; ZORRILLA, P.; FLORES, M.; JERCIC, M.I.; CRISANTE, G.; AÑEZ, N.; CASTRO, A.M.; GONZALEZ, C.I.; VIANA, K.A.; YACHELINI, P.; TORRICO, F.; ROBELLO, C.; DIOSQUE, P.; CHAVEZ, O.T.; AZNAR, C.; RUSSOMANDO, G.; BÜSCHER, P.; ASSAL, A.; GUHL, F.;

ESTANI, S.S.; DASILVA, A.; BRITTO, B.; LUQUETTI, A.; LADZINS, J. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5(1), 2011.

SCHIJMAN, A.G.; VIGLIANO, C.A.; VIOTTI, R.J.; BURGOS, J.M.; BRANDARIZ, S.; LOCOCO, B.E.; LEZE, M.I.; ARMENTI, H.A.; LEVIN, M.J. *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic chagas heart disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 210-220, 2004.

SCHMUNIS, G.A.; YADON, Z.E. Chagas Disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, p. 14-21, 2010.

SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 583-588, 2006.

SOSA-ESTANI, S.; CURA, E.; VELAZQUEZ, E.; YAMPOTIS, C.; SEGURA, E.L. Etiological treatment of young women infected with *Trypanosoma cruzi*, and prevention of congenital transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 484-487, 2009.

STEINDEL, M.; PACHECO, L.K.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M.H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T.C.M.; STOCO, P.H.; MURTA, S.M.F.; CARVALHO-PINTO, C.J.; GRISARD, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animals reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60(1), p. 25-32, 2008.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 472-481, 2001.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 495-501, 2003.

WHO. World Health Organization. Chagas disease (American Trypanosomiasis). Fact Sheet No 340, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> (Acessado em: 10/03/2014)

WHO. World Health Organization: Control of Chagas disease. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 905, 2002.

WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). **Genebra: World Health Organization**, 2010. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.

WHO. World Health Organization. Control and prevention of Chagas disease in Europe. Report of a WHO Informal Consultation (jointly organized by WHO headquarters and the WHO Regional Office for Europe) Geneva, Switzerland. **WHO**, 2009.

WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological record. **WHO**, n. 6, v. 90, p. 33-44, 2015.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78(1), p.87-111, 2006.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.G.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; SILVA, E.L.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM, N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 240-253, 2012.

CAPÍTULO II

2.1 SHORT COMMUNICATION: “PCR OF HEMOCULTURE AS STRATEGY TO IMPROVE THE DETECTION OF *Trypanosoma cruzi* IN THE CHRONIC PHASE OF CHAGAS DISEASE”

**PCR OF HEMOCULTURE AS STRATEGY TO IMPROVE THE DETECTION OF
Trypanosoma cruzi IN THE CHRONIC PHASE OF CHAGAS DISEASE**

Ana Flávia de A. Piovesani¹, Angélica S. Mizutani, Érika C. Ferreira², Divina S. O. Marques³,
Silvana M. de Araújo¹, Mônica L. Gomes¹

¹Laboratório de Doença de Chagas, Parasitologia Humana, Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá (DBS/UEM); ²Departamento de Estatística/UEM, ³Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

Corresponding author:

E-mail address: mlgomes@uem.br.

SUMMARY

In order to associate the specificity of hemoculture and the sensitivity of PCR, we have proposed to perform the PCR from samples obtained from hemoculture (PCR-HC) of 79 patients in the chronic phase of Chagas disease. In addition to the PCR-HC, the methods of hemoculture and PCR of blood (PCR-BL) were performed. To carry out the PCR-HC, hemoculture and PCR-BL were used 2.4 mL of hemoculture sediment, 30 mL and 10 mL of blood, respectively. The DNA was extracted of each sample and the fragment of 330 bp from *Trypanosoma cruzi* minicircle was amplified. The PCR-HC ($p=0.00005$) and the PCR-BL ($p=0.00121$) were significantly more positive than the hemoculture. The positivity of the PCR-HC was also significantly higher ($p=0.00032$) than the PCR-BL. We have concluded that the PCR-HC is a valid alternative method to increase the detection of the parasite, improving the parasitological diagnosis and identification of treatment failure.

Keywords: Diagnosis, Chagas disease, PCR of blood, PCR of hemoculture, hemoculture.

1. Introduction

Currently, 7 to 8 million people are infected with *Trypanosoma cruzi* all around the world, especially in Latin American countries, where Chagas disease is endemic.¹ During the chronic phase of infection, which is characteristic of low parasitemia, methods of parasitological diagnosis become limited. Thus, the association between a highly specific method such as hemoculture (100%)^{2,3} and the high sensitivity of the PCR (76.4 to 100%)^{2,4} could be an interesting approach to increase the detection capability of *T. cruzi* in patients in the chronic phase of infection. In this context, a pilot study was proposed to perform PCR from hemoculture samples obtained from patients in the chronic phase of Chagas disease.

2. Materials and methods

Seventy-nine patients with reagent ELISA method, who were attended in 2012 in the Chagas Disease Laboratory of the Universidade Estadual de Maringá (UEM) and ambulatory of the Hospital Universitário de Londrina, were recruited for this study. The age of these patients ranged from 35 to 89 years, with an average of 60.5 ± 9.9 . Females were predominant, corresponding to 55.7% of the studied population. The patients signed a free and informed consent form approved by Permanent Committee of Ethics in Research Involving Human Beings (COPEP) of UEM, under protocol number 012/2010.

The hemoculture (HC) was performed with 30 mL of blood distributed in six heparinized conical tubes (15 mL). The tubes were centrifuged at 4 °C, 209.44 rad/s for 30 minutes to remove the plasma and add Liver Infusion Tryptose medium as previously described⁵, with modifications. Once a week, the tubes were homogenized and every 30 days for a total of 180 days a pellet aliquot was analyzed. After these 180 days, 0.4 ml of the pellet of each one of the six tubes, totaling 2.4 mL, was added to an equal volume of Guanidine-HCl 6M / EDTA 0.2M for PCR analysis of hemoculture (PCR-HC). After one week at room temperature, these samples were boiled at 100 °C for 15 min and stored at 4 °C until use.⁶

The PCR of blood (PCR-BL) was performed with 10 mL of blood collected in a conical tube (50 mL) containing an equal volume of Guanidine-HCl 6M / EDTA 0.2M⁷ to extraction and amplification of DNA.

The DNA extraction and the conditions of PCR reaction and revelation of the amplified products were performed according to Gomes et al.⁸ The DNA was amplified in an

automatic thermocycler (Techne® TC - 512 Staffordshire, England). The extraction and amplification of DNA were monitored using negative controls (non-infected individuals from non-endemic areas) and positive controls (individuals infected with *T. cruzi*). The amplified products were visualized on 4% polyacrylamide gels, revealed by silver salts and digitally stored.

Data analysis was performed using *Software SAS 9.1*. The *Chi-square test* was used to investigate possible associations between variables. The significance level was 5% ($p < 0.05$).

3. Results

The hemoculture was positive in 15.2% (12/79) of the patients and the PCR-HC detected 39.2% (31/79), being the difference between these methods significant ($p=0.00005$). Twenty-seven (34.2%) patients were positive by PCR-BL, with an also significant difference ($p=0.00121$) in relation to hemoculture (Table 1, Figure 1).

For 31 patients with PCR-HC positive, 18 (58.1%) were also positive by PCR-BL. For 48 patients with PCR-HC negative, 9 (18.7%) were positive by PCR-BL. Even so, the number of patients with PCR-HC positive (31/79) was significantly higher ($p=0.00032$) when compared to those detected by PCR-BL (27/79) (Table 2).

4. Discussion

In order to increase the detection of *T. cruzi* in patients in the chronic phase of Chagas disease, the specificity of hemoculture was associated with the sensitivity of PCR and the PCR-HC was carried out. This method compared with the PCR-BL and with the hemoculture showed higher detection capability of the parasite.

The performance of the PCR-HC carried out in samples collected at 180 days (period of higher positivity of the hemoculture) was significantly better, when compared with PCR-BL ($p=0.00032$) and the HC ($p=0.00005$). The PCR-BL also showed a higher parasite detection capability than the HC, with a significant difference between these two methods, agreeing with other authors.^{2,4,7,9} The hemoculture was the method with the lowest detection capability of the parasite, however, it is important to consider its fundamental role for the diagnosis of infection by *T. cruzi*. It is also important to emphasize that the detection of the parasite was higher only when the HC was associated with the PCR (PCR-HC). It should be noted that even in the absence of the parasite multiplication, PCR-HC can detect parasites independent of Discrete Typing Unit (DTU) that belong, differing from HC that can select a

DTU over another, depending on the time required for growth and development of the parasite. Other authors have also associated the molecular method of conventional PCR with the parasitological method of xenodiagnosis (PCR-XD), and have observed an increase in *T. cruzi* detection capability when compared to the parasitological method carried out singly.^{9,10}

The association between the PCR and the HC (PCR-HC) was important to increase the parasite detection capability, because this method was also significantly better when compared to PCR-BL. This is the first study reporting a significant difference when two methods with distinct approaches (HC and PCR) were associated. Another study⁹ that associated the PCR with xenodiagnosis, showed no significant difference when compared to PCR-BL. The highest positivity of the PCR-HC can be explained by the larger volume of blood used in the hemoculture and by the parasite multiplication in the culture medium, which does not occur with the PCR-BL. Even the PCR-HC detecting the parasite in a significantly higher number of samples compared to PCR-BL, 9 samples were only positive by PCR-BL and 13 were only positive by PCR-HC. These results suggest that the combination of these two methods can be important to increase the number of individuals diagnosed. The DNA degradation or presence of inhibitors in the samples may explain this discrepancy in results.

We concluded that the PCR-HC is a valid alternative and choice to increase the detection of *T. cruzi* in patients in the chronic phase of infection. The association of this method with the PCR-BL increases the number of individuals with positive results and improves the diagnosis of the chronic phase and the identification of therapeutic failure. Despite the long time required for obtaining results by PCR-HC, this study opens possibilities for a more systematic analysis, in order to decrease the amount of time and verify if the association of real-time PCR with hemoculture can further increase the detection of *T. cruzi*.

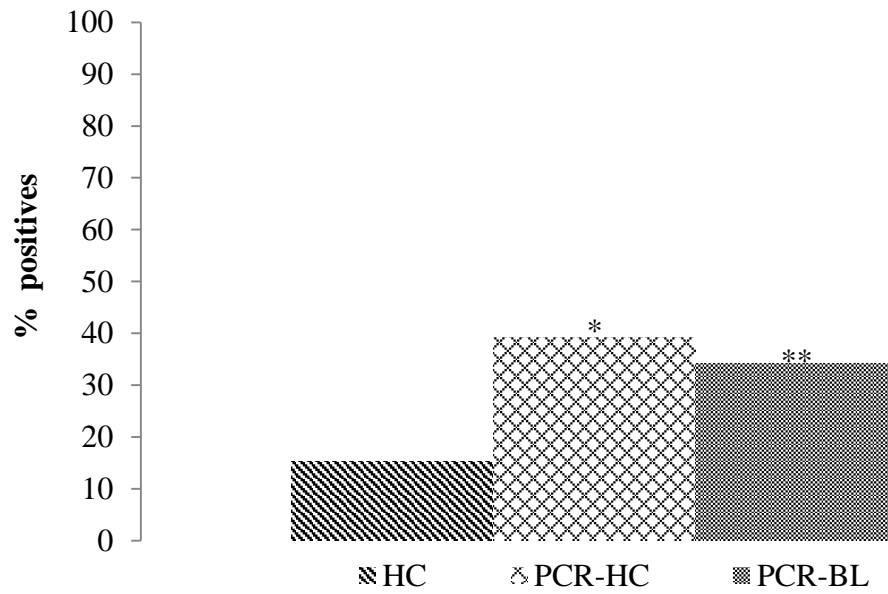
Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. WHO. World Health Organization. Chagas disease (American Trypanosomiasis). Fact Sheet No 340, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> (Acessado em: 10/03/2014).
2. GILBER SR, ALBAN SM, GOBOR L, BESCROVAINE JO, MYIAZAKI ML, THOMAZ-SOCCOL V. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;**46**(3):310-5.
3. FERNANDES CD, TIECHER FM, FERNANDES DD, HENRIQUES NMP, STEINDEL M. High rates of positive hemocultures in children and teenagers infected by *Trypanosoma cruzi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;**94**(1):7-8.
4. GOMES ML, GALVAO LM, MACEDO AM, PENA SD, CHIARI E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitological, molecular and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1999;**60**(2):205-210.
5. CHIARI E, DIAS JCP, LANA M, CHIARI CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989;**22**(1):19-23.
6. BRITTO C, CARDOSO M, WINCKER P, MOREL CMA. Simple protocol for cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993;**88**:171-172.
7. AVILA HA, BORGES-PEREIRA J, THIEMANN O, PAIVA E, DEGRAVE W, MOREL CM, et al. 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**(9):2421-6.
8. GOMES ML, MACEDO AM, VAGO AR, PENA SDJ, GALVÃO LMC, CHIARI E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 1998;**88**:28-33.
9. ZULANTAY I, APT W, VALENCIA C, TORRES A, SAAVEDRA M, RODRÍGUEZ J, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. *J Antimicrob Chemother* 2011;**66**:2224-6.
10. SAAVEDRA M, ZULANTAY I, APT W, MARTÍNEZ G, ROJAS A, RODRÍGUEZ J. Chronic Chagas disease: PCR-xenodiagnosis without previous microscopic observation is a useful tool to detect viable *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res* 2013;**46**:295-8.

Figure 1

Positivity of the hemoculture (HC), PCR of hemoculture (PCR-HC) and PCR of blood (PCR-BL) in patients infected with *Trypanosoma cruzi* (n=79).



*Significant difference between HC and PCR-HC; **Significant difference between HC and PCR-BL; $p \leq 0.05$.

Table 1

Comparison of the hemoculture (HC) results with the PCR of hemoculture (PCR-HC) and the PCR of blood (PCR-BL) in patients infected with *Trypanosoma cruzi* (n=79).

Variables	HC				p
	P		N		
	n	%	n	%	
PCR-HC					
P	11	13.9	20	25.3	0.00005*
N	1	1.3	47	59.5	
PCR-BL					
P	9	11.4	18	22.8	0.00121**
N	3	3.8	49	62.0	

*Significant difference between HC and PCR-HC; **Significant difference between HC and PCR-BL; $p \leq 0.05$; P = Positive; N = Negative.

Table 2

Comparison of the PCR of hemoculture (PCR-HC) with the PCR of blood (PCR-BL) in samples from patients infected with *Trypanosoma cruzi* (n=79).

Variables	PCR-HC				<i>p</i>
	P		N		
	n	%	n	%	
PCR-BL					
P	18	22.8	9	11.4	0.00032*
N	13	16.5	39	49.4	

*Significant difference between the methods: $p \leq 0.05$; P = Positive; N = Negative.

CAPÍTULO III

3.1 CONCLUSÕES

- 1) A PCR a partir de amostras obtidas da hemocultura pode ser utilizada para melhorar a detecção do *T. cruzi* em pacientes na fase crônica da infecção.
- 2) A PCR-HC apresentou maior positividade que a PCR-SG e portanto pode ser uma alternativa válida para o diagnóstico de infecção pelo *T. cruzi* e acompanhamento pós-terapêutico.
- 3) Os métodos moleculares da PCR-HC e PCR-SG foram mais sensíveis que a hemocultura, método parasitológico sabidamente menos sensível.
- 4) A associação da PCR-HC com a PCR-SG poderia ampliar o número de indivíduos com resultados positivos melhorando o diagnóstico de fase crônica e a identificação de falha terapêutica.

3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Propõe-se que amostras da hemocultura sejam coletadas periodicamente para a realização da PCR, com o intuito de aumentar a positividade deste método e reduzir o tempo de detecção do *T. cruzi*. O processamento das amostras pode ser realizado após o início do cultivo da hemocultura, a cada 30 dias até o término da hemocultura.

Para a PCR-HC pode-se utilizar a estratégia da PCR em tempo real podendo avaliar qualitativamente se ocorre aumento da positividade e quantitativamente para comparar a parasitemia entre pacientes que tenham ou não recebido tratamento.

É proposto ainda avaliar experimentalmente a positividade de diferentes DTU de *T. cruzi* para os métodos da PCR-HC e PCR-SG, comparando os resultados entre si e com os resultados da análise da hemocultura.