

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA

ANGÉLICA SAYURI MIZUTANI

Modificação no protocolada hemocultura melhora positividade e concordância
com resultados sorológico e molecular na doença de chagas crônica

Maringá
2013

ANGÉLICA SAYURI MIZUTANI

Modificação no protocolo da hemocultura melhora positividade e concordância
com resultados sorológico e molecular na doença de chagas crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia
Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mônica Lúcia Gomes

Maringá
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANGÉLICA SAYURI MIZUTANI

Modificação no protocolada hemocultura melhora positividade e concordância com resultados sorológico e molecular na doença de chagas crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ªDr^ª Mônica Lúcia Gomes

Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria de Castro

Universidade Federal de Goiás/UFG

Prof^ªDr^ª Silvana Marques de Araújo

Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dr^ª. Sandra Mara Alessi Aristides

Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dr^ª. Denise Lessa Aleixo

Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 30 de junho de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedicado a minha família e aos meus amigos, por todo o apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca desistir de mim, por me encher de bênçãos, mesmo que eu não mereça tanto. Prova de Seu amor infinito e incondicional.

Aos meus pais, Sr. João e D. Luzia, a minha irmã Cláudia, meu cunhado Cícero e meu sobrinho Mateus, que sempre estiveram ao meu lado, mesmo quando eu acreditei no contrário.

Aos meus tios, Sr. Ossamo e D. Setsu, por me acolherem em sua casa, durante esse período de mestrado.

A minha grande amiga Fabiana, pelo apoio, pelas risadas, e principalmente, pelo exemplo de superação frente às adversidades.

Ao Marlon, meu Encantado, que tornou minha realidade melhor que qualquer sonho que eu pudesse imaginar. Pela força, por nunca me deixar desistir. E pelas sopinhas e macarronadas.

A Lara, pela enorme paciência ao me treinar e me ajudar em meus experimentos.

A minha estagiária, agora mestranda, Ana Flávia, que com sua dedicação e empenho, foi meu sopro de ar fresco, minha maior incentivadora nos momentos de cansaço.

A técnica Sandra Vieira, por colaborar na realização dos meus trabalhos, e principalmente, pelos conselhos e pelo carinho.

A Edna, da Imunologia Básica, pelas coletas das nossas amostras e pelas conversas durante as viagens à Londrina.

As minhas parceiras de trabalho, Pâmela, Chris, Camila e Alexandra do setor de Imunologia Básica.

Aos pacientes que participaram desse projeto, muitos com histórias lindas para contar e palavras marcantes, que me serviram de incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários e professores do Setor de Parasitologia Básica da UEM, por compartilharem conhecimentos e por me receberem de braços abertos e por tornarem esse setor um dos melhores lugares para se trabalhar.

A Lu, secretária do PBF, por toda sua prestatividade e competência.

Aos alunos do Laboratório de Chagas, Amanda, Bianca, Cris, Thais, Renata, Neide, Carol, Camila, Carina, Franciele, Elisama, Natália... por toda a amizade e apoio.

A Marta Bertóli, pelo auxílio nas realizações dos exames de ELISA.

A John Carroll Dye, cuja vida rica em atos de generosidade e compaixão, me inspirou a ser uma pessoa melhor.

E finalmente, à minha orientadora, Prof^a. Dra. Mônica Lúcia Gomes, que ao me aceitar como sua aluna, me deu a oportunidade de crescer, não só profissionalmente, mas como ser humano. E sem a qual nada disso teria sido possível.

EPÍGRAFE

É assim que Deus nos dá inspiração: Ele
coloca em nossas almas o que nossas
mentes não conseguem imaginar.

Roma Downey como Monica, na
série Touched by an Angel, episódio "Psalm 151"

Modificação no protocolo da hemocultura melhora positividade e concordância com resultados sorológico e molecular na doença de Chagas crônica

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi modificar o protocolo da hemocultura, aumentando o tempo de cultivo e positividade e compará-la com os métodos de ELISA e PCR em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol (53) e não tratados (40). A hemocultura foi avaliada a cada 30 dias aumentando o tempo total de observação de 120 para 180 dias. A parasitemia de cada paciente foi classificada de acordo com a positividade da hemocultura em relação ao número de tubos e ao tempo necessário para detecção do parasito. A positividade da hemocultura foi de 1/93 (1,08%) até 120 dias de observação preconizados na literatura e de 12/93 (12,9%) até 180 dias proposto nesse trabalho, correspondendo a um incremento de 1.194%. Entre os pacientes com hemocultura positiva 4 (7,5%) eram tratados e 8 (20%) não tratados, sendo que a positividade ocorreu em sua maioria (11/12) entre 150 e 180 dias, com incremento de 91,7%, em relação aos 120 dias. A maioria dos pacientes apresentou baixa parasitemia de acordo com os critérios utilizados. A hemocultura positiva em pacientes tratados e não tratados concorda em 100% com a ELISA e 75% com a PCR. A hemocultura negativa concorda com a ELISA e PCR em 77,6% dos pacientes tratados, mas a comparação desses três métodos entre os tratados e os não tratados não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$). Pequena modificação, como o prolongamento no tempo de cultivo, foi suficiente para aumentar a positividade da hemocultura em altos percentuais. Esse método concordou com a ELISA e PCR em maior percentual em pacientes não tratados com hemocultura positiva e em pacientes tratados com hemocultura negativa.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, hemocultura, parasitemia, PCR, ELISA, tratamento etiológico.

Change on hemoculture protocol improves positivity and concordance with serological and molecular results on chronic Chagas disease

ABSTRACT

The aim of this study was to modify the hemoculture protocol, increasing the cultivation time and positivity, and compare it with ELISA and PCR methods in patients with Chagas disease treated with benznidazole (53) and untreated (40). Hemoculture was evaluated each 30 days increased total observation time from 120 to 180 days. Each patient's parasitemia was classified according to hemoculture positivity, in relation to number of tubes and required time for detection of the parasite. Hemoculture positivity was 1/93 (1.08%) up to 120 days of observation recommended in literature and 12/93 (12.9%) up to 180 days proposed in this work, corresponding to an increase of 1,194%. Among patients with positive hemocultures, 4 (7.5%) were treated and 8 (20%) untreated, and the positivity occurred mostly (11/12) between 150 and 180 days, an increase of 91.7% , in relation to 120 days. Most of patients showed low parasitemia according to used criteria. Positive hemoculture in treated and untreated patients agrees 100% with ELISA and 75% with PCR. Negative hemoculture agrees with ELISA and PCR in 77.6% of treated patients, but these three methods comparison between treated and untreated patients showed no significant difference ($p > 0,05$). Small change, such as extending the culture time, was enough to increase the hemoculture positivity in high percentages. This method agreed with ELISA and PCR in higher percentage in untreated patients with positive hemocultures and in treated patients with negative hemocultures.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, hemoculture, parasitemia, PCR, ELISA, etiologic treatment.

Dissertação elaborada e formatada conforme
as normas da publicação científica:

Acta Parasitologica

Disponível em:

<http://versita.com/ap/authors/paper/>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	11
1.1	Introdução.....	11
1.2	Justificativa.....	14
1.3	Objetivos.....	15
1.4	Referências.....	16
2	CAPÍTULO II.....	19
2.1	Modificação no protocolo da hemocultura melhora positividade e concordância com resultados sorológico e molecular na doença de Chagas crônica.....	20
3	CAPÍTULO III.....	44
3.1	Conclusões.....	44
3.2	Perspectivas Futuras.....	45

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas (1879-1934) em 1909, a doença de Chagas atinge cerca de 7 a 8 milhões de pessoas no mundo todo, a maioria na América Latina, onde essa enfermidade é endêmica (WHO 2013).

Causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, essa doença apresenta uma fase aguda, com duração de 4 a 12 semanas, geralmente assintomática ou sob a forma de uma doença febril auto-limitante (Rassi Jr *et al.* 2010). Em alguns casos, porém, podem ocorrer miocardite e encefalites, levando o indivíduo à morte (Luz 1999). A alta parasitemia e baixa concentração de anticorpos são as características desta fase, sendo o diagnóstico realizado por meio de visualização direta do parasito em exame de sangue a fresco ou por métodos de concentração, como o micro-hematócrito e a técnica de Strout (Salomone *et al.* 2003, Ministério da Saúde – Consenso Brasileiro em Doença de Chagas 2005, Viottiet *et al.* 2006, Ferrer *et al.* 2012).

Cerca de 2 a 4 meses após a infecção, ocorre evolução para a fase crônica (Batista *et al.* 2010). Em 60-70% dos casos há ausência de sintomas clínicos, eletrocardiograma de repouso e radiografias do tórax, esôfago e cólon normais e a presença de testes sorológicos positivos caracterizando a forma indeterminada da doença. Nos outros 30-40% dos casos, a enfermidade manifesta-se como forma cardíaca, digestiva, ou mista 10 a 15 anos após a infecção (Rassi Jr *et al.* 2010, Tarleton Zhang 1999).

Como na fase crônica a parasitemia é baixa e intermitente e os níveis de anticorpos da classe IgG são elevados (Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda 2003), o diagnóstico é essencialmente sorológico e realizado pelos métodos ELISA, Imunofluorescência Indireta (IFI) e Hemaglutinação Indireta (HAI). A sensibilidade desses métodos normalmente é alta (Pereira *et al.* 2012), mas podem ocorrer resultados falso-positivos e falso-negativos (Galvão *et al.* 1993, Salomone *et al.* 2003, Moncayo e Yanine 2006, Caballero *et al.* 2007, Batista *et al.* 2010). O diagnóstico parasitológico é realizado por métodos indiretos, como a hemocultura e o xenodiagnóstico. Esses métodos apresentam baixa sensibilidade, mas resultados positivos são inquestionáveis e indicam a presença do parasito no sangue circulante (Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda 2003, Ferrer *et al.* 2012), tornando-os 100% específicos.

Variações na sensibilidade da hemocultura têm sido observadas por vários autores (Minter-Goedble *et al.* 1978, Luz 1999, Gomes *et al.* 2000, Castro *et al.* 2002, Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda 2003, Siriano *et al.* 2011), pois a positividade desse método depende do número de amostras e da quantidade de sangue coletado, do tempo entre a coleta e o processamento da amostra, do tempo de cultivo, dos reagentes utilizados e da experiência do executor (Galvão *et al.* 1993, Castro *et al.* 2002, Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda 2003). Após três coletas sucessivas por paciente ou estendendo o tempo de observação por mais do que 120 dias vários autores observaram aumento de positividade da hemocultura (Minter-Goedble *et al.* 1978, Gomes *et al.* 2000, Castro *et al.* 2002, Siriano *et al.* 2011). Assim como a hemocultura, a pesquisa do DNA do parasito pela reação em cadeia da polimerase (PCR), também apresenta variações na sensibilidade, que pode estar relacionada com vários fatores como os protocolos de extração e amplificação do DNA, com a presença de inibidores nas amostras clínicas, com a população estudada, com a molécula alvo a ser analisada, com a unidade de tipagem distinta (DTU) do parasito, com a experiência do executor, dentre outros (Gomes *et al.* 1998, Miyamoto *et al.* 2006, Ramirez *et al.* 2009, Llaguno *et al.* 2011, Schijman *et al.* 2011). Embora mais sensível que os métodos parasitológicos convencionais, esse método é indicado por vários autores como auxiliar nos casos em que o diagnóstico sorológico é inconclusivo (Miyamoto *et al.* 2006, Ramirez *et al.* 2009, Ferrer *et al.* 2012). Normalmente não é recomendado na rotina laboratorial, devido à discordância com os resultados de testes sorológicos, à necessidade de infraestrutura e treinamento especializado e ao custo (Ramirez *et al.* 2009, Amato Neto 2012).

O único composto disponível no Brasil, para o tratamento etiológico da doença de Chagas, é o benzonidazol (LAFEPE, Pernambuco/Brasil) que age sobre as formas tripomastigota e amastigota (Bern *et al.* 2007). Na fase aguda, o tratamento deve ser realizado em todos os casos em que o diagnóstico for confirmado, independente da via de transmissão. Na fase crônica o tratamento é indicado aos pacientes de 18 a 50 anos (Ferrer *et al.* 2012), na forma indeterminada, digestiva e cardíaca leve, sendo contra indicado nos casos com cardiopatia chagásica grave (Apt *et al.* 2008, Ferrer *et al.* 2012). Em pacientes com mais de 50 anos o tratamento é opcional, devido ao maior risco de toxicidade ao medicamento nessa faixa etária (Bern *et al.* 2007). Viotti *et al.* (2006), observaram que o tratamento com benzonidazol diminuiu o desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia chagásica em adultos.

Após o tratamento o Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (2005) preconiza que a cura é a ocorrência de resultado sorológico e parasitológico negativos. No entanto, os índices de anticorpos levam décadas para negativar (Viotti *et al.* 2006, Ferrer *et al.* 2012), a PCR só é útil no acompanhamento pós-tratamento de pacientes com resultados negativos nos métodos parasitológicos indiretos (Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda 2003, Ramirez *et al.* 2009) e a ocorrência de método parasitológico positivo indica fracasso terapêutico (Ferrer *et al.* 2012). Com base nessas informações o objetivo desse trabalho foi modificar o protocolo da hemocultura, aumentando o tempo de cultivo e positividade, e compará-la com os métodos de ELISA e PCR em pacientes com doença de Chagas tratados e não tratados.

JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Doença de Chagas da UEM prioriza a melhoria no atendimento ao paciente com sorologia positiva para essa doença. Nesse sentido, o tratamento etiológico é preconizado para pacientes que apresentem condições clínicas para recebê-lo. Mesmo não ocorrendo a cura do indivíduo, observa-se uma melhora no prognóstico clínico e laboratorial após o tratamento como observado por Viotti *et al.* 2006, e nos pacientes atendidos pelo nosso laboratório. Até o momento os métodos disponíveis para o acompanhamento do paciente tratado apresentam limitações. Os métodos sorológicos levam décadas para negativar ou diminuir significativamente os títulos e os parasitológicos apresentam baixa sensibilidade. O método molecular, embora mais sensível que os métodos parasitológicos convencionais, não é recomendado na rotina laboratorial, devido à discordância com os resultados de testes sorológicos, à necessidade de infra-estrutura e treinamento especializado e ao custo. Como esses métodos são de fundamental importância para monitorar a falha terapêutica, torna-se relevante aumentar a positividade dos mesmos. Neste contexto, foi proposto nesse trabalho modificar o protocolo da hemocultura, aumentando o tempo de cultivo e a positividade, melhorando o diagnóstico, o isolamento do parasito e o monitoramento terapêutico. Foi proposto ainda comparar a hemocultura com os métodos sorológico e molecular em um grupo de pacientes com doença de Chagas tratados e não-tratados.

OBJETIVOS

GERAL:

Modificar o protocolo da hemocultura aumentando o tempo de cultivo e positividade e compará-la com os métodos sorológico e molecular em pacientes com doença de Chagas tratados e não tratados.

ESPECÍFICOS:

Pesquisar pela técnica de hemocultura modificada a presença do parasito no sangue dos pacientes com doença de Chagas tratados e não tratados;

Pesquisar pela ELISA os níveis de anticorpos no plasma de pacientes tratados e não tratados;

Pesquisar pela PCR a presença do DNA de *T. cruzi* no sangue dos pacientes tratados e não tratados;

Comparar os resultados dos métodos ELISA, hemocultura e PCR em pacientes tratados e não tratados.

REFERÊNCIAS

- Amato Neto V. 2012. *Trypanosomacruzi*: the supposed removal of the use of the xenodiagnosis and blood culture. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 54(4), 235-236. DOI: 10.1590/S0036-46652012000400012.
- Apt B.W., Heitmann G.I., Jercic L.M.I., Jofré M.L., Muñoz C.V.P., Noemí H.I., San Martín V.A.M., Sapunar P.J., Torres H.M., Zulantay A.I. 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. Revista Chilena de Infectología, 25(5), 384-389. DOI: 10.4067/S0716-10182008000500013.
- Batista A.M., Aguiar C., Almeida E.A., Guariento M.E., Wanderley J.S., Costa S.C.B. 2010. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. International Journal of Infectious Diseases, 14, 974-977. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.05.017.
- Bern C., Montgomery S.P., Herwaldt B.L., Rassi Jr A., Marin-Neto J.A., Dantas R.O., Maguire J.H., Acquatella H., Morillo C., Kirchhoff L.V., Gilman R.H., Reyes P.A., Salvatella R., Moore A.C. 2007. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. The Journal of American Medical Association, 298(18), 2171-2181, DOI: 10.1001/jama.298.18.2171
- Caballero Z., Sousa O., Marques W., Saez-Alquezar A., Umesawa E.S. 2007. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosomacruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. Clinical and Vaccine Immunology, 14(8), 1045-1049. DOI: 10.1128/CVI.00127-07.
- Castro A.M., Luquetti A.O., Rassi A., Rassi G.G., Chiari E., Galvão L.M.C. 2002. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosomacruzi*. Parasitology Research, 88, 894-900. DOI: 10.1007/s00436-002-0679-3
- Ferrer E., Lares M., Vietri M., Medina M. 2012. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.09.007>.
- Galvão L.M.C., Nunes R.M.B., Cançado J.R., Brener Z., Krettli A.U. 1993. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-

- up study. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 87, 220-223. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90501-G](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(93)90501-G).
- Gomes, M.L., Macedo, A.M., Vago, A.R., Pena, S.D.J., Galvão, L.M.C., Chiari, E. 1998. *Trypanosomacruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Experimental Parasitology, 88, 28-33. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1998.4191>.
- Gomes M.L., Cassarotti D.J., Ramos M., Zanzarini P.D., Galvão L.M.C., Chiari E., Araújo S.M. 2000. Clinical, laboratory and epidemiological data of chronic chagasic patients residing in the northwestern region of the State of Paraná, Brazil. Acta Scientiarum, 22(2), 587-592.
- Llaguno M., Pertili L.A.R.R., Silva M.V., Bunazar P., Reges A.M., Faleiros A.C.G., Lages-Silva E., Rodrigues Jr V., Silva V.J.D., Correia Filho D. 2011. The relationship between heart rate variability and serum cytokines in chronic chagasic patients with persistent parasitemia. Pacing and Clinical Electrophysiology, 34, 724-735. DOI: 10.1111/j.1540-8159.2010.03025.x.
- Luz, Z.M.P. 1999. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94(suppl I), 295-298. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700053>
- Ministério da Saúde, Brasil. 2005. Consenso Brasileiro de doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38(3), 7-29.
- Minter-Goedbloed E., Minter D.M., Marshall T.F.C. 1978. Quantitative comparison between xenodiagnosis and haemoculture in the detection of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in experimental and natural chronic infections. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 72, 217-225. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90196-7](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(78)90196-7).
- Miyamoto C.T., Gomes M.L., Marangon A.V., Araújo S.M., Bahia M.T., Lana M., Toledo M.J.O. 2006. *Trypanosomacruzi*: sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. Experimental Parasitology, 112, 198-201. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2005.10.006>.

- Moncayo A., Yanine M.I. 2006. An update on Chagas' disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 100, 663–77. DOI: 10.1179/136485906X112248.
- Pereira G.A., Louzada-Neto F., Barbosa V.F., Ferreira-Silva M.M., Moraes-Souza H. 2012. Performance of six diagnostic tests to screen for Chagas disease in blood banks and prevalence of *Trypanosomacruzi* infection among donors with inconclusive serology screening based on the analysis of epidemiological variables. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 34(4), 292-7. DOI: 10.5581/1516-8484.20120074.
- Portela-Lindoso A.A.B., Shikanai-Yasuda M.A. 2003. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Revista de Saúde Pública*, 37(1), 107-115. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102003000100016>.
- Ramirez J.D., Guhl F., Umezawa E.S., Morillo C.A., Rosas F., Marin-Neto J.A., Restrepo S. 2009. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), 3945-3951. DOI: 10.1128/JCM.01601-09.
- Rassi Jr A., Rassi A., Marin-Neto J.A. 2010. Chagas Disease, *Lancet*, 375, 1388- 1402. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- Salomone A.O., Basquiera A.L., Sembaj A., Aguerri A.M., Reyes M.E., Omelianuk M., Fernández R.A., Enders J., Palma A., Barral, J.M., Madoery R.J. 2003. *Trypanosomacruzi* in persons without serologic evidence of disease. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 1558–62. DOI: 10.3201/eid0912.030008.
- Siriano L.R., Luquetti A.O., Avelar J.B., Marra N.L., de Castro A.M. 2011. Chagas disease: increased parasitemia during pregnancy detected by hemoculture. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 569–574. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10-0015.
- Tarleton R.L., Zhang L. 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitology Today*, 15, 94–9. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01398-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01398-8).
- Viotti R., Vigliano C., Armenti H., Segura E. 1994. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *American Heart Journal*, 127(1), 151–162. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-8703\(94\)90521-5](http://dx.doi.org/10.1016/0002-8703(94)90521-5).

WHO. 2013. Chagas disease (American Trypanosomiasis). FactSheet No 340. (consultado Maio. 2013). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>

CAPÍTULO II

**Artigo: “MODIFICAÇÃO NO PROTOCOLO DA HEMOCULTURA MELHORA
POSITIVIDADE E CONCORDÂNCIA COM RESULTADOS SOROLÓGICO E
MOLECULAR NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA”**

**CHANGE ON HEMOCULTURE PROTOCOL IMPROVES POSITIVITY AND
CONCORDANCE WITH SEROLOGICAL AND MOLECULAR RESULTS ON
CHRONIC CHAGAS DISEASE**

Angélica S. Mizutani¹, Lara M. K. Demeu¹, Marta Bertoli², Érika C. Ferreira³, Márcia M.O.
Dalalio⁴, Divina S. O. Marques⁵, Max J. O. Toledo¹, Silvana M. de Araújo¹, Mônica L.
Gomes^{1*}.

¹Laboratório de Doença de Chagas, Parasitologia Básica, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil;

²Hemocentro Regional de Maringá, Paraná, Brasil;

³Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil;

⁴Laboratório de Imunogenética, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil;

⁵Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

*Autor de correspondência: mlgomes@uem.br

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi modificar o protocolo da hemocultura, aumentando o tempo de cultivo e positividade, e compará-la com os métodos de ELISA e PCR em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol (53) e não tratados (40). A hemocultura foi avaliada a cada 30 dias aumentando o tempo total de observação de 120 para 180 dias. A parasitemia de cada paciente foi classificada de acordo com a positividade da hemocultura em relação ao número de tubos e ao tempo necessário para detecção do parasito. A positividade da hemocultura foi de 1/93 (1,08%) até 120 dias de observação preconizados na literatura e de 12/93 (12,9%) até 180 dias proposto nesse trabalho, correspondendo a um incremento de 1.194%. Entre os pacientes com hemocultura positiva 4 (7,5%) eram tratados e 8 (20%) não tratados, sendo que a positividade ocorreu em sua maioria (11/12) entre 150 e 180 dias, com incremento de 91,7%, em relação aos 120 dias. De acordo com os critérios utilizados a maioria dos pacientes apresentou baixa parasitemia. A hemocultura positiva em pacientes tratados e não tratados concorda em 100% com a ELISA e 75% com a PCR. A hemocultura negativa concorda com a ELISA e PCR em 77,6% dos pacientes tratados, mas a comparação desses três métodos entre os tratados e os não tratados não mostrou diferença significativa ($p>0,05$). O tempo de cultivo prolongado aumentou a positividade da hemocultura em altos percentuais e a concordância com ELISA e PCR, ocorrendo em maior percentual em pacientes não tratados com hemocultura positiva e em pacientes tratados com hemocultura negativa.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, hemocultura, parasitemia, PCR, ELISA, tratamento etiológico.

ABSTRACT

The aim of this study was to modify the hemoculture protocol, increasing the cultivation time and positivity, and compare it with ELISA and PCR methods in patients with Chagas disease treated with benznidazole (53) and untreated (40). Hemoculture was evaluated each 30 days increased total observation time from 120 to 180 days. Each patient's parasitemia was classified according to hemoculture positivity, in relation to number of tubes and required time for detection of the parasite. Hemoculture positivity was 1/93 (1.08%) up to 120 days of observation recommended in literature and 12/93 (12.9%) up to 180 days proposed in this work, corresponding to an increase of 1,194%. Among patients with positive hemocultures, 4 (7.5%) were treated and 8 (20%) untreated, and the positivity occurred mostly (11/12) between 150 and 180 days, an increase of 91.7% , in relation to 120 days. Most of patients showed low parasitemia according to used criteria. Positive hemoculture in treated and untreated patients agrees 100% with ELISA and 75% with PCR. Negative hemoculture agrees with ELISA and PCR in 77.6% of treated patients, but these three methods comparison between treated and untreated patients showed no significant difference ($p > 0,05$). Small change, such as extending the culture time, was enough to increase the hemoculture positivity in high percentages. This method agreed with ELISA and PCR in higher percentage in untreated patients with positive hemocultures and in treated patients with negative hemocultures.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, hemoculture, parasitemia, PCR, ELISA, etiologic treatment.

INTRODUÇÃO

Atualmente existem 7 a 8 milhões de portadores de doença de Chagas no mundo, estando a maioria na América Latina, onde a doença é endêmica (WHO 2013). Devido à migração desses indivíduos para países não endêmicos a doença tem se tornado um problema de saúde mundial (Schmunis e Yadon 2010).

A fase aguda da infecção caracteriza-se por alta parasitemia e baixa concentração de anticorpos, sendo o diagnóstico realizado pela visualização do parasito em exame de sangue a fresco, ou por métodos de concentração, como o micro-hematócrito e a técnica de Strout (Salomone *et al.* 2003, Ministério da Saúde – Consenso Brasileiro em Doença de Chagas 2005, Ferrer *et al.* 2012). Dois a quatro meses após a infecção, ocorre evolução para a fase crônica (Batista *et al.* 2010), com queda da parasitemia, que pode permanecer baixa ou intermitente, e elevação dos níveis de anticorpos da classe IgG (Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda 2003). O diagnóstico nessa fase é essencialmente sorológico e realizado pela ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), imunofluorescência indireta (IFI) e hemaglutinação indireta (HAI). A sensibilidade desses métodos normalmente é alta (Pereira *et al.* 2012), mas podem ocorrer resultados falso-positivos e falso-negativos (Galvão *et al.* 1993, Gomes *et al.* 2000, Salomone *et al.* 2003, Moncayo e Yanine 2006, Caballero *et al.* 2007, Batista *et al.* 2010).

O diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença é realizado pelos métodos indiretos de hemocultura e xenodiagnóstico, que embora apresentem baixa sensibilidade, são totalmente específicos por detectarem a presença do parasito no sangue circulante (Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda 2003, Ferrer *et al.* 2012). Variações na sensibilidade da hemocultura podem ocorrer em função do número de coletas realizadas, da quantidade de sangue coletado, do tempo entre a coleta e o processamento do sangue, do tempo de cultivo, dos reagentes utilizados e da experiência do executor (Minter-Goedble *et al.* 1978, Chiari *et al.* 1989, Luz 1999, Gomes *et al.* 2000, Castro *et al.* 2002, Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda 2003, Siriano *et al.* 2011). Vários autores relataram aumento na positividade desse método realizando três coletas sucessivas por paciente ou estendendo o tempo de cultivo para mais de 120 dias, sendo 180 dias o tempo máximo de cultivo descrito na literatura (Minter-Goedble

et al. 1978, Chiari *et al.* 1989, Galvão *et al.* 1993, Gomes *et al.* 2000, Castro *et al.* 2002, Siriano *et al.* 2011).

Assim como a hemocultura, a pesquisa do DNA do parasito pela reação em cadeia da polimerase (PCR), também apresenta variações na sensibilidade, que pode estar relacionada com os protocolos de extração e amplificação do DNA, com a presença de inibidores nas amostras clínicas, com a população estudada, com a molécula alvo a ser analisada, com a unidade de tipagem distinta (DTU) do parasito, com a experiência do executor, dentre outros fatores (Gomes *et al.* 1998, Miyamoto *et al.* 2006, Ramirez *et al.* 2009, Llaguno *et al.* 2011, Schijman *et al.* 2011). Embora mais sensível que os métodos parasitológicos convencionais, a PCR é indicada por vários autores como auxiliar nos casos em que o diagnóstico sorológico é inconclusivo ou para monitorar pacientes que receberam tratamento etiológico (Ramirez *et al.* 2009, Ferrer *et al.* 2012). Normalmente não é recomendada na rotina laboratorial, devido à discordância com os resultados de testes sorológicos, à necessidade de infra-estrutura e treinamento especializado e ao custo (Ramirez *et al.* 2009, Amato Neto 2012).

Obenzonidazol (LAFEPE, Pernambuco/Brasil) é o único composto disponível no Brasil para o tratamento etiológico da doença de Chagas (Aptet *et al.* 2008), sendo indicado na fase crônica aos pacientes de 18 a 50 anos (Ferrer *et al.* 2012) com forma indeterminada, digestiva e cardíaca leve e não recomendado na cardiopatia chagásica grave (Aptet *et al.* 2008, Ferrer *et al.* 2012). Em pacientes com mais de 50 anos, o tratamento é opcional, devido a maior toxicidade do medicamento nessa faixa etária (Bern *et al.* 2007). O tratamento também é indicado para pacientes em fase indeterminada que aceitam realizá-lo em instituições de pesquisa. Viottiet *et al.* (2006), observaram que o tratamento com benzonidazol diminuiu o desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia chagásica em adultos. Vários outros estudos também mostraram os benefícios do tratamento etiológico (Bern *et al.* 2007, Aptet *et al.* 2008, Lana *et al.* 2009). Após o tratamento o Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (2005) preconiza que a cura é a ocorrência de resultado sorológico e parasitológico negativos. No entanto, os índices de anticorpos levam décadas para negativar (Viottiet *et al.* 2006, Ferrer *et al.* 2012), a PCR só é útil no acompanhamento pós-tratamento de pacientes com resultados negativos nos métodos parasitológicos indiretos (Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda 2003, Ramirez *et al.* 2009) e a ocorrência de método parasitológico positivo indica fracasso terapêutico (Ferrer *et al.* 2012). Neste contexto, foi proposto nesse trabalho modificar o protocolo da hemocultura, aumentando o tempo de cultivo e positividade, melhorando o

diagnóstico, o isolamento do parasito e o monitoramento terapêutico. Foi proposto ainda comparar a hemocultura com os métodos sorológico e molecular em um grupo de pacientes com doença de Chagas tratados e não-tratados.

MATERIAIS E MÉTODOS

População estudada:

Participaram desse estudo todos os pacientes atendidos no Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá e no Ambulatório do Hospital Universitário de Londrina no ano de 2012. A Tabela I apresenta as características dos 93 pacientes, divididos em dois grupos, tratados a pelo menos 10 anos atrás com benzonidazol 5-7 mg/kg/dia por no mínimo 30 dias (53) e não-tratados (40). A idade variou entre 35-78 anos, nos tratados, com idade média de $57,8 \pm 9$ anos e nos não tratados, o intervalo foi de 35-87 anos e idade média de $61,2 \pm 11,3$ anos. O gênero feminino predominou tanto nos tratados como nos não tratados. Os pacientes atendidos eram residentes nas regiões Norte e Noroeste do Paraná, Brasil (Figura 1) e tiveram como principal estado de origem o Paraná (48/93=51,6%), seguido dos estados de São Paulo (17/93=18,3%), Minas Gerais (16/93=17,2%) e vários estados da região Nordeste (12/93=12,9%) (Tabela I). Quanto a idade, sexo e origem geográfica não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela I).

Hemocultura: Trinta mililitros de sangue obtidos em coleta única por meio de tubos à vácuo heparinizados foram imediatamente colocados em banho de gelo. O sangue foi distribuído em seis tubos Falcon de 15 mL, centrifugado a 4°C a 2500 rpm e lavado e cultivado em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) de acordo com Chiariet *al.* (1989). Os tubos foram incubados a 28°C e homogeneizados duas vezes por semana. A cada 30 dias uma alíquota do sedimento foi analisada por microscopia óptica estendendo o tempo de cultivo de 120 dias proposto por Chiariet *al.* (1989) para 180 dias. A parasitemia foi classificada com base no proposto por Luz *et al.* (1998) e Castro *et al.* (2002) com modificações em relação ao número de tubos positivos na hemocultura: alta: 5-6 tubos positivos; média: 3-4 tubos positivos; baixa: 1-2 tubos positivos e nula: ausência de parasitos em todos os tubos.

A parasitemia foi ainda avaliada de acordo com o tempo necessário para a detecção do parasito, sendo que, quanto menor o tempo de detecção maior o nível de parasitemia. Positivização a 90 dias: alta parasitemia, a 150 dias: média e a 180 dias: baixa. Com

material processado a partir do tubo original da hemocultura foi determinada a unidade de tipagem distinta (DTU) dos parasitos pela análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição da subunidade 2 da citocromo oxidase (RFLP-COII) de acordo com Abolis *et al.* (2011).

ELISA: Esse método foi realizado utilizando o plasma obtido durante o processamento das hemoculturas e os reagentes Chagas Test ELISA III (Bioschile, Chile), de acordo com as instruções do fabricante. Absorbância igual ou maior que o valor do cut-off $\pm 10\%$ deste valor, foi considerado reagente. A zona indeterminada foi definida pelos valores de absorbância encontrados entre o cut-off $\pm 10\%$, e os resultados nessa zona foram considerados duvidosos. As amostras foram testadas em duplicata e em caso de resultados duvidosos as amostras foram repetidas em duplicata. Em todas as reações foram incluídos controles positivos e negativos de indivíduos comprovadamente infectados ou não pelo *T. cruzi*.

IFI: As amostras com resultados de ELISA indeterminado ou não reagente foram analisadas por esse método utilizando o soro do paciente, antígeno Imunocruzi (Biolab, Brasil) e anti-imunoglobulina G humana conjugada à fluoresceína (Laborclin, Brasil). Foram consideradas positivas as amostras com título ≥ 40 .

PCR: 10 mL de sangue foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL contendo igual volume de Guanidina – HCl 6M/EDTA 0,2M. Após uma semana em temperatura ambiente, as amostras foram fervidas a 100°C por 15 min (Britto *et al.* 1993) e estocadas a 4°C até o uso. A extração do DNA, as condições de reação e visualização dos produtos amplificados foram realizadas de acordo com Gomes *et al.* (1998). Os produtos amplificados pela PCR foram observados em gel de poliacrilamida a 4,5%, revelados pela prata e digitalmente documentados.

Aspectos éticos: Este estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (COPEP – UEM), sob o parecer de número 012/2010.

Análise estatística: Os dados obtidos foram organizados em Planilha do Microsoft Excel 2010 e analisados posteriormente no Software Statistica 8.0. Foi utilizado o Teste t para comparação de médias e o teste Z para comparação dos pacientes tratados e não tratados. O nível de significância estatística utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Incremento na positividade da hemocultura, sua relação com a parasitemia e tipagem molecular dos parasitos infectando pacientes tratados e não tratados

A positividade da hemocultura foi de 1/93 (1,08%) até 120 dias de observação preconizados por Chiariet *al.* (1989) e de 12/93 (12,9%) até 180 dias proposto nesse trabalho, correspondendo a um incremento de 1.194%.

Entre os pacientes com hemocultura positiva 4 (7,5%) tratados e 8 (20%) não tratados (Tabela II), a positividade ocorreu entre 150 e 180 dias para a maioria (11/12) com incremento de 91,7%, em relação aos 120 dias. A análise de RFLP-COII mostrou que os pacientes estavam infectados com parasitos pertencentes à DTU *T. cruzi* II (TcII). De acordo com o tempo de cultivo a positividade da hemocultura foi aos 180 dias para a maioria (3/4 - 75% tratados e 4/8 - 50% não-tratados) dos pacientes indicando baixa parasitemia. Para um paciente tratado e 3 não tratados a positividade ocorreu aos 150 dias (média parasitemia) e para um não tratado aos 90 dias (alta parasitemia) (Tabela III).

Como pode ser observado na tabela IV, a parasitemia, de acordo com o número de tubos positivos, foi baixa em 3 e alta em um dos pacientes tratados, baixa em 6 e média em dois dos pacientes não-tratados. Do total de pacientes com hemocultura positiva 75% (9/12) apresentaram baixa parasitemia, 16,7% (2/12) média parasitemia e 8,3% (1/12) alta parasitemia. Se compararmos individualmente os resultados obtidos para cada paciente a partir dos dois parâmetros utilizados para a classificação da parasitemia (tempo necessário para detecção do parasito e número de tubos positivos), o nível de concordância foi de 58,3% (7/12). Nenhuma parasitemia foi detectada em 81 (87%) pacientes (Tabela IV).

Resultados dos métodos de ELISA, hemocultura e PCR em pacientes tratados e não tratados

A tabela II mostra que não houve diferença significativa entre pacientes tratados e não tratados para os resultados de ELISA ($p=0,2866$), hemocultura ($p=0,0996$) e PCR ($p=0,1047$).

Na maioria dos pacientes tratados (38/53=71,7%) e não tratados (33/40=82,5%) a ELISA foi reagente. Em 13 pacientes tratados e três não tratados o resultado desse método foi

fraco reagente (Tabela II). ELISA não reagente foi observada em quatro pacientes (um tratado e três não tratados), que também apresentaram IFI negativa. Dois pacientes (um tratado e um não tratado) com resultado indeterminado para ELISA tiveram IFI negativa.

A hemocultura e PCR apresentaram resultado negativo para a maioria dos pacientes tratados (49/53=92,5%; 39/53=73,6%) e não tratados (32/40=80,0%; 21/40=52,5%), respectivamente (Tabela II).

Os resultados dos métodos de ELISA, hemocultura e PCR dos pacientes tratados e não tratados não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) em relação às características demográficas (sexo, idade e origem geográfica).

Comparação dos resultados da hemocultura com a ELISA e PCR em pacientes tratados e não tratados

A tabela V mostra que todos os pacientes com hemocultura positiva (4 tratados e 8 não tratados) apresentaram ELISA reagente (100%). Para os 81 pacientes com hemocultura negativa, a ELISA foi reagente em 34 (69,4%) tratados e em 25 (78,1%) não tratados. Em 16 (13 tratados e 3 não tratados) pacientes com hemocultura negativa a ELISA foi fraco reagente, não havendo diferenças significativas para os resultados destes métodos entre os dois grupos.

Dos pacientes com hemocultura positiva 75% também tiveram PCR positiva, sendo três tratados e seis não tratados. Nesse grupo ainda foram observados três pacientes (um tratado e dois não tratados) com PCR negativa (Tabela V). Dos 81 pacientes com hemocultura negativa 11 (22,4%) tratados e 13 (40,6%) não tratados tiveram PCR positiva. Nesse grupo 38 (77,6%) pacientes tratados e 19 (53,4%) não tratados tiveram também a PCR negativa. A comparação da hemocultura com a PCR não mostrou diferença significativa entre os grupos estudados (Tabela V).

DISCUSSÃO

No presente estudo a realização da hemocultura a partir de uma única coleta de sangue e cultivo por um período maior do que 120 dias preconizado na literatura (Chiarinet *al.* 1989) aumentou a positividade em percentuais importantes. Predominou a baixa parasitemia entre os pacientes tratados e não tratados e não houve diferença significativa para a positividade de

hemocultura, PCR e ELISA entre esses dois grupos. Luz *et al.* (1994) também observaram altos percentuais de positividade propondo modificações como a hemocultura realizada uma ou três vezes, o tempo de processamento do sangue diminuído, a homogeneização suave e o exame realizado até 120 dias do cultivo. Esses autores ainda observaram o predomínio de baixa parasitemia entre os pacientes analisados.

Em relação ao protocolo mais amplamente utilizado para executar a hemocultura (Chiari *et al.* 1989), o fato de prolongar o tempo de cultivo para 180 dias permitiu um incremento de positividade da hemocultura de 1.194% considerando o total de pacientes e de 91,7% para o grupo com hemocultura positiva. Se fosse considerado o tempo de análise de até 120 dias preconizado por Chiari *et al.* (1989), apenas um (8,3%) paciente não tratado apresentaria o resultado positivo para este método, com a detecção do parasito aos 90 dias de cultivo. Outros autores também observaram maior positividade da hemocultura quando esta foi avaliada até 120-150 dias (Galvão *et al.* 1993, Castro *et al.* 2002, Siriano *et al.* 2011). Se considerarmos esse tempo de análise, ainda teremos um aumento expressivo (7/12 - 58,3%) de positividade aos 180 dias, pois apenas 4 (33,3%) pacientes tiveram a hemocultura positiva aos 150 dias. Melhorar a positividade da hemocultura vem sendo proposto desde a década de 1950, como bem relatado por Minter-Goedbloed *et al.* (1978), até os dias atuais (Castro *et al.* 2002, Siriano *et al.* 2011). Minter-Goedbloed *et al.* (1978) também mostraram um número aumentado de hemoculturas positivas quando estas foram examinadas até 180 dias, mas sendo a positividade igual ou menor do que o xenodiagnóstico. Provavelmente, esses resultados estejam relacionados ao fato de que esses autores utilizaram um protocolo muito diferente do proposto por Chiari *et al.* (1989), como meio de cultivo diferente (Warren ao invés do LIT), menor volume de sangue (1 a 2 mL ao invés de 30 mL), sem remoção do plasma e lavagem das células no meio, tornando-o menos utilizado. Com base nesses dados da literatura a contribuição dos resultados do presente trabalho é que uma modificação simples permitiu um incremento importante na positividade da hemocultura e nos alerta que ao longo de todos esses anos a ampla utilização do protocolo de Chiari *et al.* (1989) sem essa modificação pode ter deixado de detectar e isolar o parasito em percentual considerável de pacientes.

Diversos autores aumentaram a sensibilidade da hemocultura com maior número de coletas realizadas (Albuquerque *et al.* 1972, Mourão e Chiari 1975, Jorge Baez 1993, Luz *et al.* 1994, Luz *et al.* 1998, Castro *et al.* 2002). No presente trabalho realizando uma única coleta de sangue e aumentando o tempo de análise a positividade da hemocultura melhorou

em percentuais expressivos. Essa modificação aumentou a positividade sem ter que realizar o método várias vezes, sem o paciente ter que se deslocar várias vezes ao laboratório, amenizando custos, embora aumente o tempo de estocagem do material, de detecção e isolamento do parasito, o número de exames a ser realizado e riscos de contaminação devido maior manipulação.

Os dois parâmetros utilizados para avaliar a parasitemia dos pacientes mostraram que a maioria (11/12 - 91,7%) apresentou baixa ou média parasitemia, sendo três tratados e oito não tratados. Embora tenha havido predominância de parasitemia mais baixa em pacientes não tratados, elas também ocorreram em pacientes tratados, o que era de se esperar, uma vez que há diminuição da parasitemia em pacientes com doença de Chagas crônica ao longo do tempo e que o benzonidazol exerce influência sobre a parasitemia (Castro *et al.* 1999, Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda 2003, Apt 2008, Fernandes *et al.* 2009). Castro *et al.* (2006) observaram uma diminuição da parasitemia em maior percentual dos pacientes tratados (20/27 = 70,4%) em relação aos não tratados (6/13 = 46,2%). Esses autores classificaram a parasitemia desses pacientes como de média ou alta, diferente do observado em nosso trabalho. Essa diferença pode estar relacionada com a própria variação da parasitemia em indivíduos residindo em diferentes áreas endêmicas, com a complexidade do ciclo de vida do *T. cruzi* ou com os critérios utilizados para a classificação da parasitemia. Castro *et al.* (2002, 2006) observaram que a maioria de pacientes não tratados teve um a dois tubos de hemocultura positivos, sendo classificados como de média parasitemia. No presente trabalho a maioria dos pacientes também tiveram 1 a 2 tubos positivos, mas foram classificados como de baixa parasitemia acordando com Luz *et al.* (1998).

A positividade mais tardia (150 – 180 dias) das hemoculturas parece mais relacionada com o grau de parasitemia do que com as características biológicas intrínsecas do parasito em questão. Os parasitos isolados dos pacientes analisados nesse trabalho pertencem a DTU TcII que sabidamente apresenta alta infectividade, maior habilidade multiplicativa e menor tempo de duplicação em relação aos parasitos TcI (Araujo *et al.* 2007, Pena *et al.* 2011). Tendo TcII essas características biológicas o maior tempo requerido para sua detecção, provavelmente, está relacionado ao número de parasitos no início da incubação, o que é condizente com a predominância de baixa parasitemia e ao alto percentual de hemoculturas negativas para o total de pacientes analisados. O encontro de parasitos dessa DTU é achado comum em

pacientes na fase crônica da doença de Chagas no sul da América do Sul (Freitas *et al.* 2005, Zingales *et al.* 2009).

Na totalidade de pacientes (4 tratados e 8 não tratados) com hemocultura positiva houve concordância com o método de ELISA, o que está de acordo com vários outros autores (Castro *et al.* 2002, Kinoshita-Yanaga *et al.* 2009, Siriano *et al.* 2011, Machado-de-Assis *et al.* 2012, Aguiar *et al.* 2012). A hemocultura positiva é mais freqüente em pacientes não tratados, mas também foi observada em 33,3% dos pacientes tratados e analisados no presente trabalho, o que é condizente com vários outros autores (Galvão *et al.* 1993, Machado-de-Assis *et al.* 2012). Dos pacientes com hemocultura negativa (81) o maior percentual de ELISA reagente ocorreu em pacientes não tratados em relação aos tratados, mas essa diferença não foi significativa, indicando que para esse grupo de pacientes o tratamento recebido não promoveu mudanças que pudessem ser detectadas por esses dois métodos.

No grupo de pacientes com hemocultura positiva houve um alto percentual (75%) de concordância com PCR, tanto nos tratados como nos não tratados, o que também foi observado por outros autores (Lana *et al.* 2009, Aguiar *et al.* 2012). Nesse grupo três pacientes (um tratado e dois não tratados) tiveram PCR negativa. Apesar da maior sensibilidade da PCR em relação à hemocultura (Gomes *et al.* 1998, 2000, Lana *et al.* 2009, Aguiar *et al.* 2012), esse resultado pode ter ocorrido devido à presença de inibidores da reação na amostra, à intermitência do parasito na corrente sanguínea, já que assim como a hemocultura a PCR depende da parasitemia do paciente (Castro *et al.* 2002, Schijman *et al.* 2011, Jackson *et al.* 2013).

No grupo de pacientes com hemocultura negativa, 29,6% apresentaram PCR positiva, resultado esse observado, principalmente, nos pacientes não tratados, comprovando maior sensibilidade da PCR, como anteriormente relatado (Gomes *et al.* 1998, 2000, Lana *et al.* 2009, Aguiar *et al.* 2012). Por outro lado, embora não houvesse diferença significativa entre os grupos, PCR negativa foi observada em maior percentual (77,6%) de pacientes tratados em relação aos não tratados. Esses valores são superiores aos encontrados por outros autores (Lana *et al.* 2009, Aguiar *et al.* 2012), e devem estar relacionados à diminuição da parasitemia promovida pelo tratamento etiológico, já observada em outros estudos (Castro *et al.* 2006, Machado-de-Assis *et al.* 2012).

CONCLUSÕES

O tempo de cultivo prolongado para 180 dias aumenta a positividade da hemocultura e a concordância deste método com ELISA e PCR ocorrendo maior percentual em pacientes não tratados com hemocultura positiva e em pacientes tratados com hemocultura negativa.

REFERÊNCIAS

- Abolis NG, Araújo SM, Toledo MJO, Fernandez MA, Gomes ML. 2011. *Trypanosomacruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta Tropica*, 120, 167-172. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.08.001>
- Aguiar C., Batista A.M., Pavan T.B.S., Almeida E.A., Guariento M.E., Wanderley J.S., Costa S.C.B. 2012. Serological profiles and evaluation of parasitaemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosomacruzi* treated with benzonidazole. *Tropical Medicine and International Health*, 17 (3), 368–373. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2011.02936.x.
- Albuquerque R.D.R., Fernandes L.A.R., Funayama G.K., Filho F.F., Siqueira A.F. 1972. Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes com reação de Guerreiro Machado positiva. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 14, 1-5.
- Amato Neto V. 2012. *Trypanosomacruzi*: the supposed removal of the use of the xenodiagnosis and blood culture. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54(4), 235-236. DOI: 10.1590/S0036-46652012000400012.
- Apt B.W., Heitmann G.I., Jercic L.M.I., Jofré M.L., Muñoz C.V.P., Noemí H.I., San Martin V.A.M., Sapunar P.J., Torres H.M., Zulantay A.I. 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Revista Chilena de Infectología*, 25(5), 384-389. DOI: 10.4067/S0716-10182008000500013.
- Araújo C.A.C., Cabello P.H., Jansen A.M. 2007. Growth behaviour of two *Trypanosomacruzi* strains in single and mixed infections: In vitro and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatomabrasiliensis*. *Acta Tropica*, 101, 225-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.02.004>
- Batista A.M., Aguiar C., Almeida E.A., Guariento M.E., Wanderley J.S., Costa S.C.B. 2010. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus.

- International Journal of Infectious Diseases*, 14, 974-977. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.05.017.
- Bern C., Montgomery S.P., Herwaldt B.L., Rassi Jr A., Marin-Neto J.A., Dantas R.O., Maguire J.H., Acquatella H., Morillo C., Kirchhoff L.V., Gilman R.H., Reyes P.A., Salvatella R., Moore A.C. 2007. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *The Journal of American Medical Association*, 298(18), 2171-2181. DOI: 10.1001/jama.298.18.2171
- Britto C., Cardoso M., Wincker P., Morel C.M.A. 1993. Simple protocol for cleavage of *Trypanosomacruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88, 171-172. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761993000100030>.
- Caballero Z., Sousa O., Marques W., Saez-Alquezar A., Umesawa E.S. 2007. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosomacruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosomarangeli* and *Leishmania* spp. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(8), 1045-1049. DOI: 10.1128/CVI.00127-07.
- Castro A.M., Luquetti A.O., Rassi A., Rassi G.G., Chiari E., Galvão L.M.C. 2002. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosomacruzi*. *Parasitology Research*, 88, 894-900. DOI: 10.1007/s00436-002-0679-3.
- Castro A.M., Luquetti A.O., Rassi A., Chiari E., Galvão L.M. 2006. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosomacruzi* infection. *Parasitology Research*, 99(4), 379-383. DOI: 10.1007/s00436-006-0172-5.
- Castro C., Macedo V., Prata A. 1999. Comportamento da parasitemia pelo *Trypanosoma cruzi* em chagásicos crônicos durante 13 anos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(2), 157-165. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821999000200007>.
- Chiari, E., Dias, J.C.P., Lana, M., Chiari, C.A. 1989. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22(1), 19-23.
- Coura J.R., Borges-Pereira J. 2012. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(3), 286-296. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000300002>.

- Ferrer E., Lares M., Viettri M., Medina M. 2012. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.09.007>.
- Fernandes C.D., Tiecher F.M., Balbinot M.M., Liarte D.B., Scholl D., Steindel M., Romanha A. 2009. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1), 27-32. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000100004>.
- Fragata Filho A.A., Correia E.B., Borges Filho R., Vasconcelos M.O., Janczuk D., Martins C.S.S. 2008. Sequence of unusual Chagas infection transmissions in the same family: mother by blood transfusion and child congenitally, with a treatment-resistant strain of *Trypanosomacruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(1), 73-75. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000100014>.
- Freitas J.M., Lages-Silva E., Crema E., Pena S.D., Macedo A.M. 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosomacruzi* directly in chronically infected human tissues. *International Journal for Parasitology*, 35, 411-417. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.023>.
- Galvão L.M.C., Nunes R.M.B., Cançado J.R., Brener Z., Krettli A.U. 1993. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 220-223. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90501-G](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(93)90501-G).
- Gomes, M.L., Macedo, A.M., Vago, A.R., Pena, S.D.J., Galvão, L.M.C., Chiari, E. 1998. *Trypanosomacruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Experimental Parasitology*, 88, 28-33. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1998.4191>.
- Gomes M.L., Cassarotti D.J., Ramos M., Zanzarini P.D., Galvão L.M.C., Chiari E., Araújo S.M. 2000. Clinical, laboratory and epidemiological data of chronic chagasic patients residing in the northwestern region of the State of Paraná, Brazil. *Acta Scientiarum*, 22(2), 587-592.
- Jackson Y., Chatelain E., Mauris A., Holst M., Miao Q., Chappuis F., Ndao M. 2013. Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after

- nifurtimox treatment. *BMC Infectious Diseases*, 13, 85 DOI: 10.1186/1471-2334-13-85.
- Jörg M.E., Báez V.J. 1993. Parasitemia en infectados crónicos por *Trypanosoma cruzi*, indeterminados y sintomáticos, evidenciada por hemocultivo. *CM Publicación Médica*, 6 (2), 71-79.
- Kinoshita-Yanaga A.T., Bértoli M., Martins V.A., Mizutani A.S., Toledo M.J.O., Araújo S.M., Gomes, M.L. 2011. Polymerase chain reaction and blood culture in blood donors screened by ELISA test for Chagas' disease. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(1), 53-61 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502011000100007>
- Lana M., Lopes L.A., Martins H.R., Bahia M.T., Girley F Machado-de-Assis G.F., Wendling, A.P., Martins-Filho O.A., Montoya R.A., Dias J.C.P., Albajar-Viñas P., Coura J.R. 2009. Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(8), 1139-1147. DOI: 10.1590/S0074-02762009000800011.
- Luz Z.M.P., Coutinho M.G., Cançado J.R., Krettli A.U. 1994. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27, 143-148.
- Luz Z.M.P. 1998. Hemoculturas em Indivíduos na Fase Crônica pelo *Trypanosoma cruzi*: Modificações na Metodologia Visando à Simplificação e Aumento da Sensibilidade da Técnica, MSc Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, 87 pp.
- Luz Z.M.P., Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. 1999. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(1), 295-298. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700053>.
- Machado-de-Assis G.F, Silva A.R., Do Bem V.A.L., Bahia M.T., Martins-Filho O.A., Dias J.C.P., Albajar-Viñas P., Torres R.M., Lana M. 2012. Posttherapeutic cure criteria in Chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(8), 1283–1291 DOI: 10.1128/CVI.00274-12.
- Ministério da Saúde, Brasil. 2005. Consenso Brasileiro de doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(3), 7-29.

- Minter-Goedbloed E., Minter D.M., Marshall T.F.C. 1978. Quantitative comparison between xenodiagnosis and haemoculture in the detection of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in experimental and natural chronic infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 217-225. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90196-7](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(78)90196-7).
- Miyamoto C.T., Gomes M.L., Marangon A.V., Araújo S.M., Bahia M.T., Lana M., Toledo M.J.O. 2006. *Trypanosomacruzi*: sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. *Experimental Parasitology*, 112, 198-201, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2005.10.006>
- Moncayo A., Yanine M.I. 2006. An update on Chagas' disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 100, 663–77. DOI: 10.1179/136485906X112248.
- Mourão O.G., Chiari E. 1975. Comprovação parasitológica na fase crônica da doença de Chagas por hemoculturas seriadas em meio LIT. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 9, 215-219.
- Pena D.A., Eger I., Nogueira L., Heck N., Menin A., Báfica A., Steindel M. 2011. Selection of TcII*Trypanosomacruzi* population following macrophage infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 204, 478–86. DOI: 10.1093/infdis/jir292
- Pereira G.A., Louzada-Neto F., Barbosa V.F., Ferreira-Silva M.M., Moraes-Souza H. 2012. Performance of six diagnostic tests to screen for Chagas disease in blood banks and prevalence of *Trypanosomacruzi* infection among donors with inconclusive serology screening based on the analysis of epidemiological variables. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 34(4), 292-7. DOI: 10.5581/1516-8484.20120074.
- Portela-Lindoso A.A.B., Shikanai-Yasuda M.A. 2003. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Revista de Saúde Pública*, 37(1), 107-115. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102003000100016>.
- Ramirez J.D., Guhl F., Umezawa E.S., Morillo C.A., Rosas F., Marin-Neto J.A., Restrepo S. 2009. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), 3945-3951. DOI: 10.1128/JCM.01601-09.

- Salomone A.O., Basquiera A.L., Sembaj A., Aguerri A.M., Reyes M.E., Omelianuk M., Fernández R.A., Enders J., Palma A., Barral, J.M., Madoery R.J. 2003. *Trypanosomacruzi* in persons without serologic evidence of disease. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 1558–62. DOI: 10.3201/eid0912.030008.
- Schijman A.G., Bisio M., Orellana L., Sued M., Duffy T., Mejia Jaramillo A.M., Cura C., Auter F., Veron V., Qvarnstrom Y., et al. 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosomacruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(1), 931. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000931
- Schmunis G.A., Yadon Z.E. 2010. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115 (1-2), 14-21. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.11.003.
- Silveira C.A.N., Castillo E., Castro C. 2000. Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33, 191-196. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822000000200006>.
- Siriano L.R., Luquetti A.O., Avelar J.B., Marra N.L., de Castro A.M. 2011. Chagas disease: increased parasitemia during pregnancy detected by hemoculture. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 569–574. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10-0015.
- Veloso V.M., Carneiro C.M., Toledo M.J.O., Lana M., Chiari E., Tafuri W.L., Bahia M.T. 2001. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosomacruzi* parental strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 1005-1011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762001000700021>
- Viotti R., Vigliano C., Lococo B., Bertocchi G., Petti M., Alvarez M.G., Postan M., Armenti A. 2006. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 144 (10), 724-734. DOI: 10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00006
- WHO. 2013. Chagas disease (American Trypanosomiasis). *Fact Sheet*, 340. (consultado Maio 2013). Available on: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>
- Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R.S., Campbell D.A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A.M., Machado C.R., Miles M.A., Romanha A.J., Sturm

N.R., Tibayrenc M., Schijman A.G. 2009. A new consensus for *Trypanosomacruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-1054. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>.

Tabela I. Características demográficas de 93 pacientes do Norte e Noroeste do Paraná, Brasil, infectados pelo *Trypanosoma cruzi* tratados (Benzonidazol) e não-tratados.

Variáveis	Grupo				p*
	Tratado (n=53)		Não tratado (n=40)		
	n	%	n	%	
Idade					
35 a 45 anos	5	9,4	3	7,5	0,9294
46 a 56 anos	17	32,1	9	22,5	0,6117
57 a 67 anos	23	43,4	17	42,5	0,9551
68 a 78 anos	8	15,1	9	22,5	0,7034
79 a 87 anos	0	0,0	2	5,0	-
Gênero					
Feminino	28	52,8	26	65,0	0,3672
Masculino	25	47,2	14	35,0	0,4648
Origem Geográfica (Estado)					
Paraná	22	41,5	26	65,0	0,1103
São Paulo	12	22,6	5	12,5	0,6457
Minas Gerais	10	18,9	6	15,0	0,8451
Bahia	6	11,3	2	5,0	0,8033
Alagoas	1	1,9	1	2,5	0,9762
Pernambuco	1	1,9	0	0,0	-
Ceará	1	1,9	0	0,0	-

*p não significativo pelo teste Z para comparação de proporções

Tabela II. Resultados dos testes de Hemocultura, *EnzymeLinkedImmunosorbentAssay* (ELISA) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos 93 pacientes do Norte e Noroeste do Paraná, infectados pelo *Trypanosoma cruzi* tratados (Benzonidazol) e não-tratados..

Variáveis	Grupo				p*
	Tratado (n=53)		Não tratado (n=40)		
	n	%	n	%	
Hemocultura					
Negativa	49	92,5	32	80,0	0,0996
Positiva	4	7,5	8	20,0	0,5884
ELISA					
Reagente	38	71,7	33	82,5	0,2866
Fraco Reagente	13	24,5	3	7,5	0,5274
Não reagente	1	1,9	3	7,5	0,8013
Indeterminado	1	1,9	1	2,5	0,9762
PCR					
Negativo	39	73,6	21	52,5	0,1047
Positivo	14	26,4	19	47,5	0,2276

*p não significativo pelo teste Z para comparação de proporções: $p > 0,05$

Tabela III. Nível de parasitemia, de acordo com o tempo de cultivo da hemoculturas de pacientes do Norte e Noroeste do Paraná, Brasil, infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, tratados com benzonidazol e não tratados.

Tempo de posituação da Hemocultura	Tratados (n)	Não-tratados (n)	Total (n)	Nível de parasitemia
90 dias	0	1	1	Alta
150 dias	1	3	4	Média
180 dias	3	4	7	Baixa

n= número de pacientes

Tabela IV. Nível de parasitemia, de acordo com o número de tubos positivos na hemocultura dos pacientes do Norte e Noroeste do Paraná, Brasil, infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, tratados com benzonidazole não-tratados

Número de tubos positivos	Tratados n (%)	Não-tratados n (%)	Total n (%)	Nível de Parasitemia
0/6	49 (92,4)	32 (80)	81 (87,0)	Nula
1/6	3 (5,7)	5 (12,5)	8 (8,6)	Baixa
2/6	0	1 (2,5)	1 (1,1)	Baixa
3/6	0	2 (5)	2 (2,2)	Média
5/6	1 (1,9)	0	1 (1,1)	Alta
Total	53 (100)	40 (100)	93 (100)	

n= Número de pacientes

Tabela V. Comparação dos resultados da hemocultura com os resultados de *EnzymeLinkedImmunosorbentAssay* (ELISA) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em pacientes do Norte e Noroeste do Paraná, Brasil, infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, tratados com benzonidazol e não tratados.

Métodos	Hemocultura Positiva				Hemocultura Negativa			
	Tratados* (n=4)		Não tratados (n=8)		Tratados* (n=49)		Não tratados (n=32)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Elisa								
Reagente	4	100,0	8	100,0	34	69,4	25	78,1
Fracoreagente	0	0,0	0	0,0	13	26,5	3	9,4
Nãoreagente	0	0,0	0	0,0	1	2,0	3	9,4
Indeterminado	0	0,0	0	0,0	1	2,0	1	3,1
PCR								
Positivo	3	75,0	6	75,0	11	22,4	13	40,6
Negativo	1	25,0	2	25,0	38	77,6	19	59,4

* Teste Z não significativo para pacientes tratados em relação aos não tratados ($p > 0,05$)

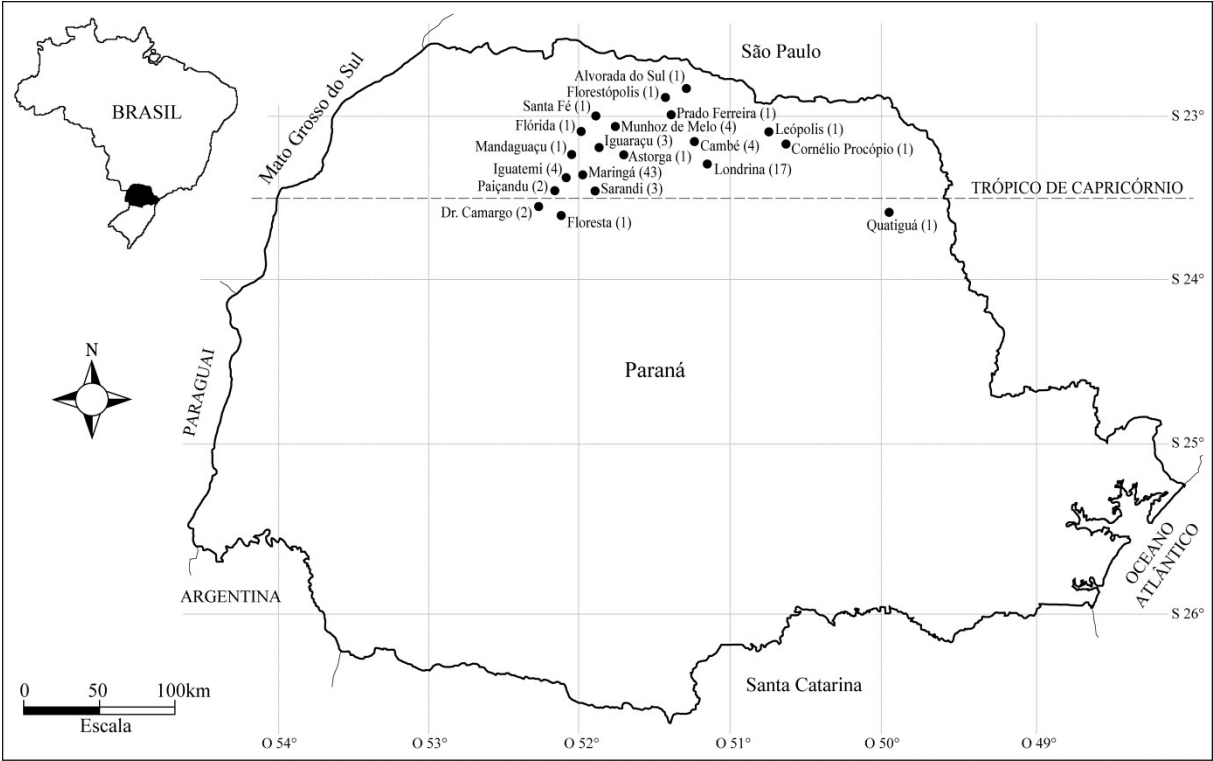


Figura 1. Municípios de residência dos pacientes infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, participantes deste estudo, Paraná, Brasil. Valores em parênteses representam o número de pacientes de cada município.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

- 1) O aumento no tempo de cultivo comprovou o aumento da positividade da hemocultura;
- 2) A positividade da hemocultura e PCR foi maior nos pacientes não tratados;
- 3) A concordância dos métodos de ELISA e PCR ocorreu em maior percentual de pacientes não tratados com hemocultura positiva e em pacientes tratados com hemocultura negativa;
- 4) Os resultados dos métodos de ELISA, hemocultura e PCR não diferiram entre pacientes tratados e não tratados, indicando que para esse grupo de pacientes o tratamento não foi efetivo ou esses métodos não foram eficientes para o acompanhamento pós-terapêutico de pacientes com doença de Chagas crônica.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A detecção tardia do *T. cruzi* observada no presente estudo pela hemocultura, evidencia a necessidade de melhorias nas técnicas utilizadas para o diagnóstico parasitológico da doença de Chagas.

Propõe-se fazer uso de técnicas mais sensíveis na detecção e quantificação do parasito, como a PCR em tempo real, a fim de compará-la com os métodos realizados no presente trabalho e verificar qual a sua contribuição no acompanhamento de pacientes com doença de Chagas tratados e não tratados.

Propõe-se aumentar o espectro de pacientes submetidos ao tratamento etiológico, a fim de verificar a sua efetividade ou não, visto que é preconizado que o tratamento promove melhora no prognóstico da doença.