

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE - HCPA  
RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL  
(QPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*  
EM SANGUE TOTAL**

FERNANDO GUIMARÃES CAVATÃO

PORTO ALEGRE - RIO GRANDE DO SUL

2022

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE - HCPA  
RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE

FERNANDO GUIMARÃES CAVATÃO

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL  
(QPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*  
EM SANGUE TOTAL**

Trabalho de conclusão de curso de  
residência apresentado como requisito parcial para  
a obtenção do título de especialista em Biologia  
Molecular no Programa de Residência em Área  
Profissional da Saúde.

ORIENTADOR: Dr. RODRIGO MINUTO PAIVA  
CO ORIENTADOR: Me. EDUARDO WANDAME GOMEZ  
COLABORADORA: Dra. ANA PAULA ALEGRETTI

PORTO ALEGRE - RIO GRANDE DO SUL

2022



## CIP - Catalogação na Publicação

Cavatão, Fernando Guimarães

Padronização e validação da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação de *Trypanosoma cruzi* em sangue total / Fernando Guimarães Cavatão. -- 2022.

55 f.

Orientador: Rodrigo Minuto Paiva.

Coorientador: Eduardo Wandame Gomez.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Análises Clínicas, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. PCR em Tempo Real. 2. Validação qPCR. 3. Doença de Chagas. 4. Infecção por *Trypanosoma cruzi*. I. Paiva, Rodrigo Minuto, orient. II. Gomez, Eduardo Wandame, coorient. III. Título.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Insetos Transmissor da Doença de Chagas.....	10
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	12
Figura 3 - Fluxograma de condutas sugeridas para doadores e receptores de órgãos com a doença de Chagas.....	17

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	07
2. JUSTIFICATIVA.....	08
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	09
3.1. Vetores.....	09
3.2. Agente etiológico e ciclo de vida.....	11
3.3. Formas de transmissão e aspectos clínicos.....	12
3.4. Taxonomia e variabilidade genética.....	13
3.5. Genoma <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	14
3.6. Transplante de órgãos e reativação parasitária.....	15
3.7. Diagnóstico.....	18
3.8. Tratamento.....	18
3.9. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) .....	19
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivos gerais.....	21
4.2. Objetivos específicos.....	21
5. MÉTODOS.....	22
5.1. Delineamento do estudo.....	22
5.2. Amostras clínicas.....	22
5.2.1. Critérios de inclusão.....	23
5.2.2. Critérios de exclusão.....	23
5.3. Processamento das amostras e extração.....	23
5.4. Ensaio de PCR em Tempo Real.....	24
5.5. Curva de concentração de <i>primers</i> e sonda.....	25
5.6. A especificidade analítica.....	25
5.7. Desempenho do ensaio.....	25
5.7.1. Eficiência de PCR.....	26
5.7.2. Faixa dinâmica linear .....	26
5.7.3. Coeficiente de Correlação ( $R^2$ ).....	26
5.7.4. Limite de detecção (LOD).....	27
5.7.5. Limite de quantificação (LOQ).....	27

<b>6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>27</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>8. ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>46</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>10. ANEXO.....</b>	<b>49</b>
<b>10.1. Termo de consentimento livre e esclarecido para adultos.....</b>	<b>49</b>
<b>10.2. Termo de consentimento livre e esclarecido para responsáveis.....</b>	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas foi descrita pelo médico e pesquisador, Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, nascido no estado de Minas Gerais, Brasil, em 9 de julho de 1878. Além de descobrir o patógeno causador, ele descreveu todas as características importantes desta nova doença: o vetor, desenvolvimento e as diferentes fases clínicas, sinais e sintomas clínicos, hospedeiros, epidemiologia e até a profilaxia de transmissão (LIDANI et al., 2019).

A doença de Chagas, uma antropozoonose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019), apresenta curso clínico bifásico, isto é, se inicia com uma fase aguda, com a presença do *Trypanosoma cruzi* na corrente sanguínea em intensa atividade, ocasionando a disseminação e infecção dos diferentes tecidos do organismo, esta fase geralmente é assintomática ou oligossintomática, sendo a febre o principal sintoma. Aproximadamente 70% das pessoas não desenvolvem sinais e sintomas, ocasionando a forma indeterminada da enfermidade. Os demais infectados podem progredir para a fase crônica, acarretando em sintomas clínicos neurológicos, cardíacos e digestivos (LIDANI et al., 2019).

Na América Latina a doença de Chagas era predominante em pessoas que viviam em regiões rurais. Entretanto, devido a urbanização e globalização, ocorrendo migração de pessoas para os grandes centros urbanos e viagens inter países e continentes, acarretou em mudanças na sua epidemiologia, espalhando-se por todo o continente americano e outros lugares do planeta (NAME, 2017).

Em 2006, na 15ª Reunião Intergovernamental na Luta contra a Doença de Chagas, estimou-se que em todo o mundo há cerca de 9 milhões de pessoas infectadas pela doença, uma redução de 8 milhões desde 1990. Experiências e estratégias contra a doença apontam que o sucesso deve-se ao controle dos vetores do parasita, uma conduta que pode e deve ser contínua (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006).

Segundo os dados do Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde Brasileiro, no período entre 2012 e 2016 foram registrados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) 1.190



casos de doença de Chagas aguda (DCA). Entre os casos, 664 (55,8%) eram homens e 17 (3,2%) mulheres que estavam gestantes. A incidência média anual de DCA foi de 0,1 casos/100 mil habitantes, destacando-se neste contexto a região norte do país que apresentou a maior proporção de casos (97,1%). Entre os casos confirmados pelo SINAN foram registrados 18 óbitos por DCA, a maioria do sexo masculino (55,0%). E neste período a taxa de letalidade anual foi de 1,5% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A principal forma de transmissão atualmente no Brasil é através da via oral, responsável por 73% de todos os casos, superando assim a tão conhecida transmissão vetorial, que ocupa o segundo lugar, com 8,9% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

## 2. JUSTIFICATIVA

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), hospital universitário de referência no Sul do país, não dispõe até o presente momento, de um teste molecular para a detecção do *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da doença de Chagas. Os exames laboratoriais dos pacientes atendidos no HCPA com suspeita desta enfermidade são enviados para um laboratório externo contratado para realização deste teste laboratorial. Devido a esta logística, o tempo de liberação do resultado deste exame é superior, quando comparado aos exames que são realizados na própria instituição. O tempo de espera para obtenção do resultado laboratorial impacta diretamente no tratamento de um paciente com resultado positivo para doença de Chagas, pois quanto mais cedo inicia-se o tratamento, maior a eficácia da terapia contra o parasita.

Sendo assim, as principais vantagens da implementação da técnica de PCR para a detecção de *Trypanosoma cruzi*, na Unidade de Diagnóstico Especializado do HCPA são: a identificação precoce do parasita em casos de transmissão congênita, reativação do parasita em indivíduos que receberam transplante de órgãos ou qualquer outra intervenção clínica que possa desencadear este quadro de

reativação. A descoberta desta mudança clínica é essencial para cura ou intervenção na progressão da doença, sendo de importância indispensável no manejo de pacientes que convivem com o protozoário. Somado a isto, a quantificação do *Trypanosoma cruzi* em pessoas no início ou retorno de tratamento, é uma medida cabível para analisar a eficácia da medicação. Outro importante benefício da implementação da técnica, é o menor custo do exame se for realizado na própria instituição, bem como evitar possíveis degradações da amostra que possam ocorrer durante o seu transporte a outros laboratórios.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Vetores

O agente transmissor da doença de Chagas é um inseto pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. São insetos hematófagos, conhecidos popularmente, no Brasil, como “Barbeiro” (MATTOS, 2017; TOLEDO et al., 2016).

Estes insetos possuem pelo menos 19 gêneros, destacando-se 3 gêneros principais: *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius*, com aproximadamente 140 espécies, capazes de transmitir o protozoário. As principais espécies responsáveis pela transmissão do parasita são *T. infestans*, *P. megistus*, *T. sórdida*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* (Toledo, 2017). Dentre as 68 espécies de triatomíneos com ocorrência no território brasileiro, os três gêneros mais frequentemente registrados são: *Panstrongylus*, *Rhodnius*, *Triatoma* e 13 espécies dentre estes de importância epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

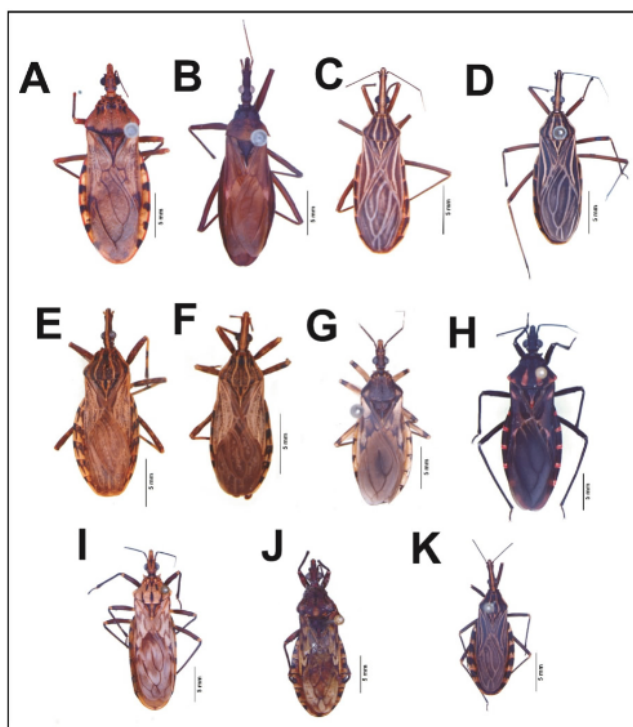
Os triatomíneos possuem três fases de metamorfose distintas: o ovo, cinco estágios ninfais e finalmente a fase adulta. Com exceção da fase do ovo, a hematofagia ocorre em todas as outras, e os insetos geralmente picam à noite. A taxa de infectividade pode variar entre as espécies, embora as domésticas sejam

importantes na transmissão do parasita ao homem, as espécies silvestres são as que possuem o maior nível de infectividade (OLIVEIRA et al., 2018).

A relação parasita e triatomíneo, embora ainda faltem estudos, mostra que o protozoário não aparenta ser patogênico ao hospedeiro invertebrado, apesar disto, um estudo utilizando grupo controle mostrou que as fêmeas de triatomíneos infectadas com o parasita depositaram menos ovos, além de uma diminuição no número de ovos férteis e menor taxa de eclosão. Outros estudos também relatam mudanças morfológicas, fisiológicas e comportamentais entre diferentes espécies de triatomíneo, resumidamente: padrões de alimentação e defecação, diminuição da aptidão reprodutiva, longevidade do inseto e aumento do tamanho das asas (OLIVEIRA et al., 2018).

**Figura 1:** Insetos Transmissor da Doença de Chagas.

- A) *P. geniculatus*; B) *E. mucronatus*; C) *R. montegrensis*; D) *R. robustus*; E) *R. pictipes*; F) *R. stali*; G) *T. sordida*; H) *P. megistus*; I) *P. lignarius*; J) *P. rufotuberculatus*; K) *R. neglectus*.



Fonte: Universidade Federal do Acre

### 3.2. Agente etiológico e ciclo de vida

A tripanossomíase americana ou Doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado, pertencente à classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, pertencente ao gênero *Trypanosoma* e subgênero *Schizotrypanum* (MATTOS, 2017). Durante o ciclo de vida ocorrem três morfologias distintas e principais do parasita, são elas:

**Amastigota:** Possui uma forma circular ovóide, imóvel, núcleo grande e um cinetoplasto em forma de bastão, com uma relação entre núcleo e citoplasma alta, ambos coram-se em vermelho ou violeta com a coloração de Giemsa e o citoplasma permanecendo azul. Não possui membrana ondulante e flagelo aparente, o flagelo permanece retido na bolsa flagelar (JORGENSEN, 2015; TOLEDO et al., 2016).

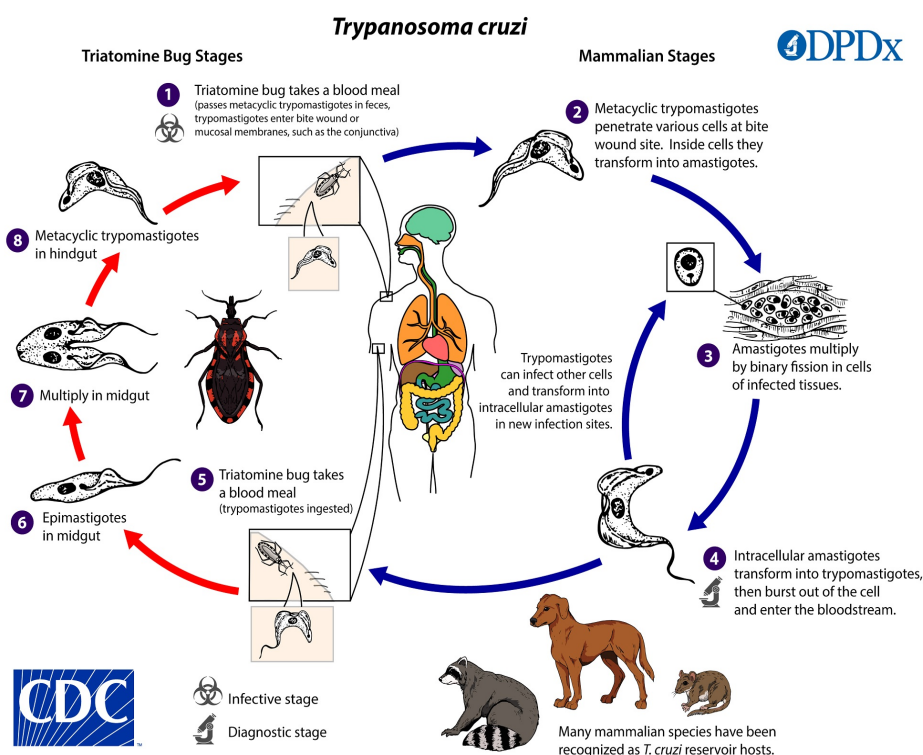
**Epimastigota:** Possui uma forma alongada, com extremidades mais estreitas que o centro, relação núcleo e citoplasma menor, flagelo partindo da porção mediana da célula associado a membrana ondulante e se tornando livre ao fim (TOLEDO et al., 2016).

**Tripomastigota:** A forma tripomastigota, alongada e achatada, em seu eixo longitudinal mede aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  e pode ser visualizado na microscopia de sangue corado em formato de C ou U. O núcleo é situado no centro do protozoário e com um cinetoplasto localizado na porção posterior final. O único flagelo se inicia no centro do protozoário e se estende ao longo da membrana externa ondulada até atingir o final da extremidade anterior e se projetar livremente. A coloração de Giemsa cora o citoplasma de azul enquanto o núcleo, cinetoplasto e o flagelo se coram em vermelho ou violeta (JORGENSEN, 2015).

O inseto Barbeiro, hospedeiro intermediário do protozoário, ingere o parasita na forma tripomastigota e este se transfere para a porção média do intestino do barbeiro, onde se modifica para a forma epimastigota. Os epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, e movem-se para as fezes do triatomíneo. Ao se alimentar de sangue humano, o barbeiro defeca próximo ao local da picada e o reflexo de “coçar” o local arrasta o parasita para o interior do hospedeiro humano, infectando-o (JORGENSEN, 2015).

No hospedeiro humano, os tripomastigotas sanguíneos invadem as células e diferenciam-se no interior destas, em amastigotas, que multiplicam-se por divisão binária. Eventualmente, as células parasitadas rompem-se e amastigotas caem na corrente sanguínea transformando-se novamente em tripomastigotas invadindo novas células, portanto ambas as formas tripomastigota e amastigota podem ser encontradas no sangue (JORGENSEN, 2015).

**Figura 2:** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

### 3.3. Formas de transmissão e aspectos clínicos

A transmissão oral do parasita nos últimos anos tem sido a mais comum causa de infecção, isso se dá por meio de alimentos contaminados com as fezes ou urina do Barbeiro com o protozoário, ou a presença do mesmo, triturado no preparo

de alimentos e ainda, alimentos que estejam crus ou mal cozidos, e dessa forma contenham o parasita (MATTOS, 2017).

A transmissão vetorial, a mais conhecida, ocorre quando no momento da picada, o triatomíneo defeca no local, sendo a porta de entrada para a penetração do parasita. A disseminação através de transfusão sanguínea ou de hemoderivados e transplante de órgãos ocorre nos casos em que os pacientes sadios recebem órgãos de pessoas infectadas. Já a transmissão vertical ou congênita ocorre em qualquer fase da gestação, por meio da via transplacentária, e em qualquer estágio da infecção. Na fase de amamentação, caso a mãe esteja na fase aguda, pode ocorrer contaminação do bebê através do leite. Caso a gestante esteja na fase crônica da doença, a infecção pode ocorrer através de uma fissura mamária e sangramento durante o aleitamento, expondo o lactente ao parasita (MATTOS, 2017).

A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por intensa parasitemia, podendo surgir como indício, um nódulo cutâneo (chagoma de inoculação) ou edema palpebral indolor (sinal de Romaña), consistente após 7 a 10 dias da picada. A fase aguda geralmente dura em torno de 40 a 60 dias e o primeiro sintoma é a febre, podendo ocorrer também náusea, vômito, diarreia, inflamação e dor nos gânglios linfáticos. Também pode ocorrer nesta fase: hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia (SILVA, 2019).

Durante a fase crônica, o parasita circula em baixíssimo número na corrente sanguínea, estando presente nos tecidos. Esta fase pode ser dividida em cardíaca e digestiva. Na fase cardíaca podem ser observadas alterações no eletrocardiograma em decorrentes inflamações do tecido cardíaco e na forma digestiva, pode ser evidenciada a presença do megaesôfago e megacólon (FERREIRA, 2013).

### **3.4. Taxonomia e variabilidade genética**

A grande diversidade genética e bioquímica das cepas de *Trypanosoma cruzi* é sabidamente conhecida a muito tempo. Devido a esta variabilidade, muitos

debates e classificações surgiram e foram alteradas ao longo do tempo. Após diversas catalogações, atualmente é consenso mundial a adoção de subgrupos para a classificação do *T. cruzi* designados como DTU, do inglês *Discrete Typing Units*, existindo então, seis DTU, *T. cruzi* I-VI (ZINGALES et al., 2009).

Esta variabilidade genética do *T. cruzi* é predominantemente clonal, contudo, pesquisas mostram que a hibridização entre diferentes subgrupos, embora rara, pode ter gerado novos DTU. TcI e TcII são linhagens antigas, TcV e TcVI podem ser oriundas de hibridização entre TcII e TcIII. O *T. cruzi* é considerado um parasita diplóide, embora haja evidências que haploidia possa ser característica de algumas espécies. Estudos mostram que os genomas de outras cepas de *T. cruzi*, e inclusive entre clones, podem variar significativamente, ademais, se evidencia também grande diversidade cariotípica entre as cepas, incluindo diversidade em tamanhos dos cromossomos homólogos (LEWIS et al., 2009).

O conhecimento e variabilidade entre os diversos DTUs mostra características específicas de cada parasita contidas neles, como: virulência, tropismo tecidual, resposta ao tratamento e reservatório geográfico. O TcI apresenta ampla distribuição na América Latina e por ser uma linhagem antiga, mostra grande dispersão no continente e uma alta variabilidade genética. Já os TcIII e TcIV estão menos relacionados ao ser humano e mais presentes em infecções em animais selvagens, sendo que dentre estes dois, o TcIV apresenta uma maior infecção em humanos. Em uma linha oposta, os TcII, V e VI estão mais relacionados com vetores e hospedeiros que coabitam espaços domésticos (NAVES, 2018).

### 3.5. Genoma do *Trypanosoma cruzi*

O parasita possui dois genomas distintos, um pertencente ao núcleo da célula e conhecido, portanto, como DNA nuclear, e o outro contido na porção final da mitocôndria, o cinetoplasto (PERSING, 2016). É descrito pela literatura uma quantidade de material genético de *T. cruzi* em torno de 0,3 pg/parasita, ocorrendo variações de 0,12 a 0,33 pg/célula entre diferentes cepas. Esta diferença entre os

genomas dos diferentes DTUs são explicadas por inserções, deleções e duplicações alterando o tamanho do cromossomo, como também pelo conteúdo de células haplóides ou diplóides durante o processo de desenvolvimento (MORAES, 2016).

O DNA nuclear é formado por sequências repetidas de 195 pares de bases, contendo  $10^4$  a  $10^5$  cópias por células do genoma nuclear (PERSING, 2016). O DNA do cinetoplasto (kDNA) representa de 20% a 25% de todo o DNA do protozoário, e diferencia-se do DNA nuclear em densidade de flutuação, relação de base e grau de renaturação. Sua estrutura é parecida com o DNA nuclear e está distribuída em uma rede composta por anéis unidos, maxicírculos 20 a 40 kb, apresentando 50 cópias por rede, e milhares de minicírculos de 1,4 kb e em torno de 5 a 20 mil por rede. Cada minicírculo possui 4 regiões de DNA conservado equidistantes em  $90^\circ$  ricas em citosina e adenina, flanqueadas por 4 regiões de DNA variável (MATTOS, 2017; MORAES, 2016; PERSING et al., 2016).

Apesar de apresentar regiões conservadas, o principal problema em utilizar o kDNA como uma região alvo para identificação do *T. cruzi* é a possibilidade de ocorrer reação cruzada com *Trypanosoma rangeli*, protozoário não patogênico, podendo gerar resultados falso-positivos para *T. cruzi*. Contudo, utilizando o genoma nuclear isto pode ser evitado (PERSING et al., 2016).

### 3.6. Transplante de órgãos e reativação parasitária

Na América Latina, a doença de Chagas é a terceira indicação para transplante cardíaco (NOGUEIRA et al., 2018). Ainda faltam informações a respeito da doação de órgãos por portadores crônicos com doença de Chagas, mas alguns estudos mostram que há diferentes taxas de transmissão para diferentes órgãos. Os rins e o fígado variam entre 10 a 20% dos casos, já os transplantes cardíacos possuem taxas muito maiores, em torno de 75% ou mais. Os doadores de órgãos com a doença devem receber tratamento de 30 a 60 dias antes do transplante. O transplante de órgãos em pacientes na fase aguda da doença deve ser prorrogado,

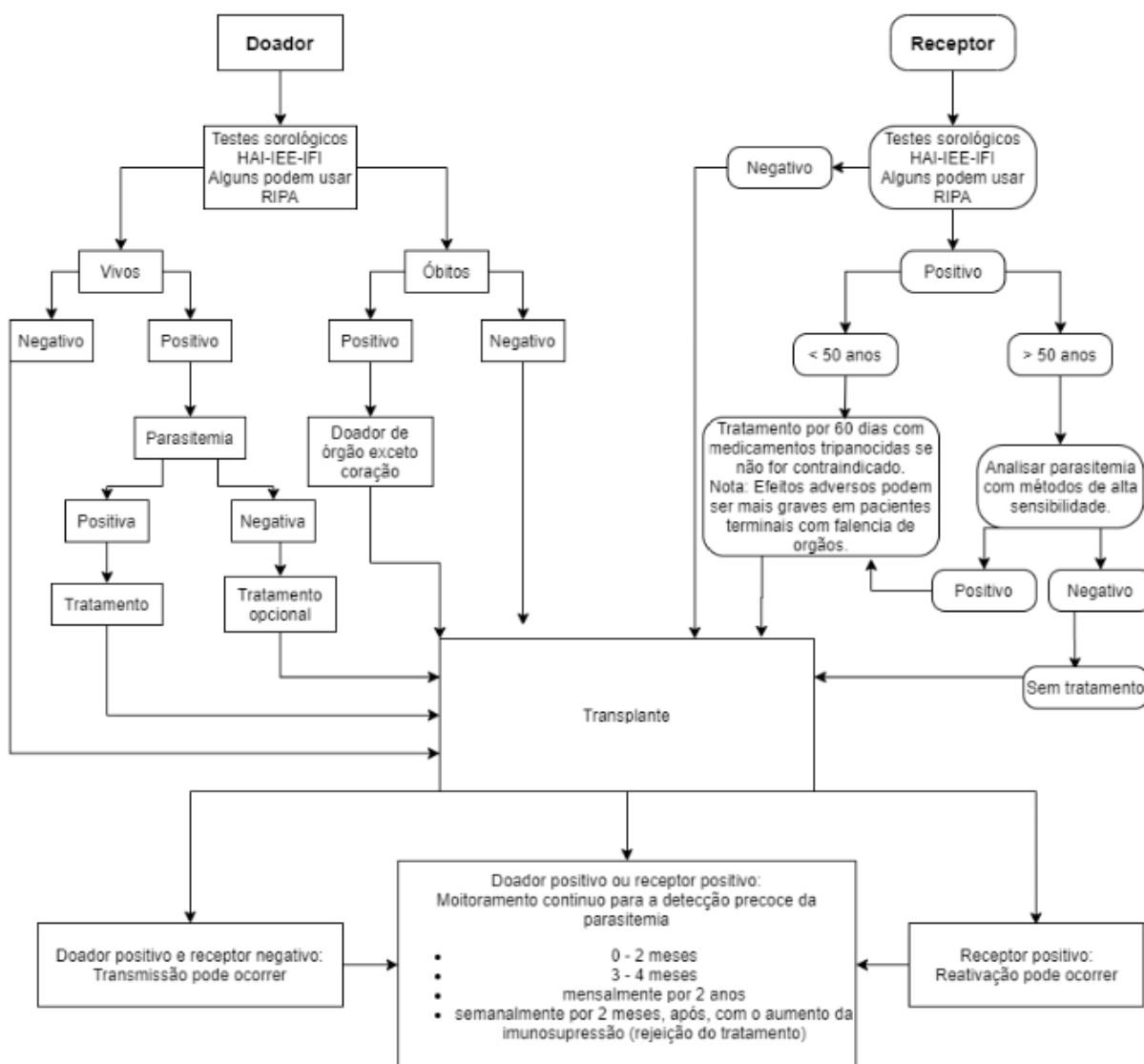


e órgãos de doadores que morreram nesta fase devem ser descartados (PIERROTTI et al., 2018).

O risco de reativação em receptores de rins com a doença é maior no primeiro ano após o transplante e posteriormente continua presente, com o aumento da imunossupressão. O transplante renal tem um risco de reativação estimado em 8,3% a 27%. Os riscos de reativação envolvendo transplante cardíaco são muito maiores, devido ao tropismo do protozoário pelo tecido cardíaco, o que resulta em taxas de reativação que variam de 26,5% a 42,9% (LATTES; LASALA, 2014).

Analisando os dados de transmissão da doença de Chagas envolvendo transplantes, verifica-se que é possível haver transplante de rins e fígado com doadores positivos para Chagas, desde que um protocolo de monitoramento rigoroso seja feito após o transplante, a fim de detectar a reativação parasitária precoce (ALTCLAS et al., 2010). A figura abaixo mostra um fluxograma de condutas para doadores e receptores de órgãos com a doença.

**Figura 3:** Fluxograma de condutas sugeridas para doadores e receptores de órgãos com a doença de Chagas.



HAI, Hemaglutinação indireta; IEE, Imunoensaio enzimático; IFI, Imunofluorescência indireta; RIPA, Radioimunoprecipitação; qPCR, PCR quantitativo

Fonte: Adaptado de (LATTES, 2014).

Títulos altos no sangue de indivíduos em estágio crônico indicam reativação da doença, sendo que os teste moleculares, por terem alta sensibilidade analítica, são ideais para detecção destes casos. Porém, devido à baixa e intermitente parasitemia que ocorre na fase crônica da doença, se faz necessário definir uma faixa de corte para realizar intervenções terapêuticas (LATTES; LASALA, 2014).

### 3.7. Diagnóstico

No Brasil, o diagnóstico da doença de Chagas deve ser feito em todos os casos suspeitos, tanto na fase aguda da doença quanto na fase crônica. O método laboratorial a ser utilizado depende da fase da doença em que o indivíduo se encontra. Na fase aguda a visualização direta do protozoário a fresco (sem coloração) por microscopia é a mais indicada. Critérios sorológicos devem ser sempre seguidos nos casos confirmados ou quando há resultados negativos, se a suspeita clínica persistir. Na fase crônica da doença o diagnóstico é essencialmente sorológico, usando dois testes, um tendo alta sensibilidade e o outro, alta especificidade (DIAS et al., 2016).

As diretrizes clínicas recomendam no mínimo dois imunoenaios para o diagnóstico da doença de Chagas, sendo imunofluorescência indireta e ELISA os mais indicados por apresentarem uma sensibilidade de 99%. A hemaglutinação indireta possui uma sensibilidade que varia entre 96% a 98%, portanto, é recomendado o uso em conjunto com outros imunoenaios. Se os resultados dos testes forem conflitantes, um terceiro teste convencional ou não convencional deve ser utilizado para concluir o diagnóstico (NOGUEIRA et al., 2018).

### 3.8. Tratamento

Diversas classes de medicamentos foram utilizadas para o tratamento da doença de Chagas, porém sem eficácia, restando apenas dois medicamentos com efeitos significativos sobre o parasita que tiveram sucesso: o Nifurtimox (derivado nitrofurano) e o Benznidazol (nitroimidazólico) (WHO, 2002). Vários estudos defendem o tratamento durante a fase aguda da doença, como descrito por Lattes (2007, p. 300) em que a administração de Benznidazol durante 30 a 60 dias na fase aguda, eleva as chances de cura parasitária para 60 a 100%, em contraste com a fase crônica, que é de 20% a 60%. Outros estudos relatam que as chances de cura

podem chegar a 80% na fase aguda, e a fase crônica apenas de 5 a 20% (RAJÃO et al., 2014).

O Nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>, Bayer, 4[(5-nitrofurfurilideno) amino] 3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido) ao sofrer processos metabólicos, se reduz criando radicais de oxigênio altamente tóxicos, sendo o protozoário sensível ao acúmulo destes radicais, ocasionando a sua morte. No entanto, sérios efeitos adversos ao ser humano como anorexia, náuseas, vômitos, vertigens, entre outros, podem ser gerados com o uso deste medicamento, podendo ser comprometida a continuidade do tratamento. (GUSTAVO GONÇALVES, 2017).

O Benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) tem como mecanismo de ação a geração de metabólitos eletrofilicos por redução do fármaco e posterior ligação covalente às macromoléculas do parasita (RAJÃO et al., 2014). Este medicamento se apresenta na forma de comprimido com 100 mg da substância ativa, com posologia recomendada de 10 mg/kg/dia em quadros agudos da doença e 5 mg/kg/dia no estado crônico, por 60 dias, sendo a dose máxima diária recomendada de 300 mg. Quando a dose diária ultrapassa os 300 mg, deve ser calculada a dose total esperada e o tempo de tratamento estendido acima dos 60 dias. O efeito adverso mais frequente é a dermatite urticariforme, ocorrendo em 30% dos usuários do medicamento no final da primeira semana de tratamento. Outros efeitos adversos menos frequentes incluem polineuropatia, anorexia, etc. A suspensão do medicamento deve ser feita no aparecimento de febre e adenomegalia, leucopenia e agranulocitose. Este medicamento não deve ser usado em gestantes, portadores de insuficiência renal e ou hepática (ANDRADE et al., 2011).

### **3.9. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste em amplificar, a partir de um genoma inteiro, qualquer sequência nucleotídica de forma seletiva, desde que, a sequência genômica completa do organismo a ser amplificada seja conhecida.

Devido ao elevado potencial de replicar milhões de cópias em questão de horas, esta técnica é notavelmente sensível e dentre as diversas aplicações, pode ser empregada na detecção de uma única molécula de um genoma inteiro de microrganismo em uma amostra de sangue do paciente. Por este motivo, a PCR é frequentemente utilizada para detectar patógenos invasores em estágios bastante iniciais da infecção (ALBERTS, 2017).

A técnica de PCR consiste da hibridização (anelamento) dos iniciadores oligonucleotídeos (*primers*) na fita molde de DNA, para que a enzima DNA polimerase possa replicar uma nova fita de forma fiel por repetidos ciclos de amplificação. Na PCR, os iniciadores são necessários para iniciar a replicação da fita de DNA e também para serem guias para que a enzima reconheça qual porção deve amplificar. Na prática, é utilizado um equipamento termociclador que aumenta a temperatura para a separação da dupla fita de DNA no início de cada ciclo, e posteriormente a temperatura diminui para os iniciadores se ligarem em cada uma das fitas e, por fim a temperatura volta a subir para a enzima começar a amplificação (FARAH, 1997).

Toda a reação é realizada em um microtubo, ao qual é adicionado solução tampão que fornecerá as condições ideais de pH, quantidade suficiente da enzima DNA-polimerase, os dois iniciadores, a amostra de DNA a ser amplificada, magnésio ( $Mg^{+2}$ ) e os quatro desoxirribonucleotídeos. A técnica utiliza uma DNA-polimerase especial que é estável a temperaturas muito mais elevadas do que a DNA-polimerase eucariótica, assim sendo, não ocorre a desnaturação da proteína com o aumento de temperatura. Repetindo os passos de desnaturação, anelamento e amplificação, em torno de 30 ciclos, se produz mais de 250 milhões de cópias a partir de uma determinada sequência molde (FARAH, 1997).

O ciclo é repetido várias e várias vezes e os fragmentos copiados anteriormente servem de molde para o próximo ciclo. Normalmente 30 a 40 ciclos são realizados para clonar uma região determinada pelos iniciadores a partir do DNA genômico. O molde original para a PCR pode ser tanto uma molécula de DNA, quanto de RNA. O DNA pode ser utilizado para obter um clone genômico completo com íntrons e éxons. Para utilização do RNA, primeiramente, se produz uma cópia de cDNA através do processo de transcrição reversa (ALBERTS, 2017).

A PCR em tempo real (qPCR), um aperfeiçoamento da técnica de PCR, utiliza um termociclador acoplado a um sistema de detecção de fluorescência, capaz de detectar e quantificar o DNA amplificado, a partir de substâncias fluorescentes contidas na reação de PCR. O DNA pode ser tanto marcado com a hibridização de oligonucleotídeos ligado com fluoróforo ou através de substância fluorescentes que se intercalam em todo o material genético (SINGH; ROY-CHOWDHURI, 2016).

Devido a sua elevada sensibilidade e especificidade, a qPCR torna-se uma ferramenta diagnóstica e prognóstica importante na doença de Chagas.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivos Gerais**

Realizar a padronização e validação da técnica quantitativa de PCR em Tempo real (qPCR) para a detecção do parasita *Trypanosoma cruzi* em sangue total de pacientes portadores da doença de Chagas.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Definir a melhor metodologia de extração do material genético do *Trypanosoma cruzi*.
- Determinar a região genômica alvo a ser amplificada a partir da seleção e desenho de *primers* e sonda específicos.
- Determinar a sensibilidade analítica e eficiência do ensaio de PCR.

## 5. MÉTODOS

### 5.1. Delineamento do estudo

Este estudo caracteriza-se como observacional analítico, do tipo transversal.

### 5.2. Amostras clínicas

A amostra clínica a ser utilizada para desenvolvimento dos ensaios será sangue periférico, colhido em tubo de EDTA sem gel separador de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul. As amostras positivas para *T. cruzi* serão selecionadas a partir dos exames sorológicos realizados na Unidade de Bioquímica Clínica deste mesmo hospital. Para conhecimento dos resultados será acessado o laudo do exame do paciente através do sistema AGHUse. As amostras serão obtidas de duas maneiras: a partir de sobras de amostras de sangue periférico, que serão descartadas, de pacientes que realizaram exames laboratoriais no HCPA, não havendo a necessidade de nova coleta de amostra; e no segundo caso quando não houver sobra de volume de sangue no laboratório. Para esta última situação, será realizada uma coleta específica, uma punção venosa periférica no paciente para esta pesquisa, somente após a concordância em participar deste estudo, mediante à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Portanto, somente os pacientes positivos para Chagas em que não haverá sobra de volume de sangue no laboratório será proposto o TCLE para participar do estudo.

Já as amostras com resultado sorológico negativo para doença de Chagas formarão o grupo controle deste estudo, sendo o material utilizado somente a partir de sobras de amostras que serão descartadas.

### 5.2.1. Critérios de inclusão

Indivíduos de ambos os sexos e todas as faixas etárias com diagnóstico de doença de Chagas, e/ou pessoas com suspeita de infecção com sinais e sintomas e/ou presentes em área endêmica.

### 5.2.2. Critérios de exclusão

Amostras de pacientes que não forem conservadas em temperatura de 2 °C a 8°C após 6 horas da coleta e que não foram submetidas ao processo de extração antes de 48 horas, serão excluídas dos testes.

### 5.3. Processamento das amostras e extração

As amostras de sangue total serão extraídas diretamente utilizando o kit comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Madison, EUA) e o restante da amostra será armazenada em freezer -80°C.

As etapas de extração seguirão conforme o protocolo de instruções do fabricante com 200 µL de tampão de lise, 20 µL de proteinase K e 200 µL da amostra (sangue total). A mistura será aquecida em termobloco a 56 °C por 10 minutos e, posteriormente, será adicionado 250 µL do reagente de ligação à coluna de sílica e depois será transferido todo o volume para a coluna de sílica, a qual passará por etapas de centrifugação e lavagem da amostra e por fim, será eluído em 60 µL de água fornecida no kit. O material eluído será armazenado em freezer -80 °C até a realização da PCR em Tempo Real.

Após a extração, o DNA será quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific Inc.) e a qualidade do



material genético será verificada pela razão A260/A280. Serão utilizadas para os ensaios somente as amostras com uma razão entre 1,8 e 2,2.

#### 5.4. Ensaio de PCR em Tempo Real

A técnica de qPCR será utilizada para identificação do *T. cruzi* a partir do DNA nuclear. Para identificação do patógeno a partir de seu DNA nuclear será utilizado um par de *primers* e sonda específicos, retirados de uma mesma sequência repetitiva do DNA satélite (satDNA), este par de *primers* amplificam uma região de 166 pares de bases. Sendo assim, o *primer forward* corresponde a 5' AST CGG CTG ATC GTT TTC GA 3' (S = G ou C), o *primer reverse* 5' AAT TCC TCC AAG CAG CGG ATA 3' e a sonda 5' CAC ACA CTG GAC ACC AA. A sonda nucleotídica será marcada na extremidade 5' com o fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína) e na posição 3' com o fluoróforo *quencher* (PIRON et al., 2007).

Para amplificação da qPCR será utilizado o kit Platinum qPCR SuperMix (Invitrogen™). As condições de termociclagem serão: incubação por 2 minutos em temperatura de 50°C para ativar a degradação da UDG, 2 minutos de incubação em 95°C para ativar a DNA polimerase, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 1 minuto (QVARNSTROM et al., 2012).

Em todos os testes será utilizado uma curva padrão com 5 níveis de concentrações realizada com diluições seriadas 1:10 do padrão. Esta curva será utilizada para quantificar a carga parasitária nas amostras.

Em todos os ensaios será utilizado um controle interno do processo de amplificação, o gene humano RNase P, a fim de verificar as substâncias que inibem a reação de PCR, degradação da amostra e evitar falsos negativos. Também serão incluídos no ensaio de PCR controle positivo (amostra verdadeiramente positiva para *T. cruzi*) e controle negativo (água isenta de DNase e RNase ao invés do DNA extraído). As reações serão realizadas no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

### 5.5. Curva de concentração de *primers* e sonda

Para determinar a melhor concentração de *primers* e sonda utilizados na reação, serão realizados testes para ambos os *primers* (*forward* e *reverse*) com diferentes concentrações: 100 nM, 300 nM e 600 nM. Após encontrar a melhor concentração de *primers*, será realizado teste com diferentes concentrações para a sonda: 50 nM, 150 nM e 200 nM. O critério para selecionar a melhor concentração de *primers* e sonda será através da análise do menor valor de *cycle threshold* (Ct) através da curva de amplificação (BROEDERS et al., 2014).

### 5.6. A especificidade analítica

A especificidade será determinada utilizando a ferramenta BLAST. Os *primers forward* e *reverse* e a sonda serão analisados através desta ferramenta, a qual compara a sequência nucleotídica inserida com o banco genômico de domínio público, a fim de determinar igualdade da sequência nucleotídica com outros microrganismos (BUSTIN et al., 2009). A especificidade será testada empiricamente também com evidências experimentais diretas, utilizando amostras positivas para *Trypanosoma rangeli*, *Leishmania sp.* e *Toxoplasma gondii*.

### 5.7. Desempenho do ensaio

O desempenho do ensaio será determinado através da análise das seguintes características: eficiência da PCR, faixa dinâmica linear, limite mínimo de detecção (LOD), limite mínimo de quantificação e precisão (BUSTIN et al., 2009).

### 5.7.1. Eficiência de PCR.

A eficiência de amplificação da PCR será estabelecida utilizando curvas de calibração, sendo determinada a partir do log da inclinação linear da curva de calibração. Especificamente, a eficiência da PCR é igual a  $(10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ , quando o logaritmo da concentração inicial do padrão (a variável independente) é plotado no eixo x e  $C_q$  (*cycle threshold*) (a variável dependente) é plotado no eixo y. O máximo teórico de 1,00 (ou 100%) indica que a quantidade de produto dobra a cada ciclo. Será considerada adequada uma eficiência com valor entre 90% a 110% (BUSTIN et al., 2009; THERMOFISHER, 2000).

### 5.7.2. Faixa dinâmica linear.

Para avaliar adequadamente a eficiência da qPCR a faixa dinâmica cobrirá 3 repetições com concentrações de  $5 \log_{10}$  do padrão. Uma inclinação da reta de -3,3 com diferença de 10% para mais ou menos será aceitável. Assim o artefato potencial em uma qPCR de 100% de eficiência é de apenas 10% para mais ou para menos

### 5.7.3. Coeficiente de correlação ( $R^2$ )

Outro parâmetro crítico para avaliar a eficiência da PCR é  $R^2$ , que é um termo estatístico que indica quão bom um valor é para prever outro. Quando  $R^2$  é 1, o valor de Y ( $C_t$ ) pode ser usado para prever com precisão o valor de X (Concentração). Um coeficiente de correlação (valor de  $R^2$ )  $\geq 0,98$  e desvio padrão  $\leq 0,250$  será aceito. (BUSTIN et al., 2009; THERMOFISHER, 2000).

#### 5.7.4. Limite de detecção (LOD)

O LOD é definido como a concentração mais baixa na qual 95% das amostras positivas são detectadas. A confirmação da LOD será determinada utilizando DNA com diluição em série de  $5 \log_{10}$  com 20 repetições de extração (BUSTIN et al., 2009; THERMOFISHER, 2000).

#### 5.7.5. Limite de quantificação (LOQ)

O LOQ é definido como a menor quantidade de material genético em uma amostra que pode ser realmente quantificada com segurança. O LOQ será aceito se a concentração mínima de ácidos nucleicos de 12 réplicas forem positivas, o coeficiente de variação (CV) do *cycle threshold* não pode ser maior que 0,5. (BUSTIN et al., 2009; THERMOFISHER, 2000).

### 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo do tamanho amostral foi utilizada a ferramenta TAP-HCPA. Considerando um nível de confiança de 95%, margem de erro de 10% e uma sensibilidade do alvo kDNA de 78%, como é referida no estudo de QVARNSTROM et al. (2012), chegou-se ao tamanho de amostra de 66 amostras positivas. Considerando um nível de confiança de 95%, margem de erro de 10% e uma especificidade do alvo kDNA de 40% como é referido em QVARNSTROM et al. (2012), chegou-se ao tamanho de amostra de 93 amostras negativas. Sendo assim, está previsto neste estudo o uso de 159 amostras de pacientes.

Para análise estatística dos dados, os métodos estatísticos que serão utilizados dependerão da distribuição dos mesmos, sendo assim, para dados

paramétricos será usado como medida de tendência central a média, para dispersão dos dados o desvio padrão e para inferência estatística teste t independente. Para os dados com distribuição não paramétrica será utilizado como uma medida de tendência central a mediana, como medida de dispersão a distância interquartil e para inferência populacional teste de Mann-Whitney. A análise descritiva de frequência será utilizada independentemente do comportamento dos dados.

## **7. RESULTADOS**

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE - HCPA  
RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE  
ANÁLISES CLÍNICAS COM ÊNFASE EM BIOLOGIA MOLECULAR

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL  
(QPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*  
EM SANGUE TOTAL**

FERNANDO GUIMARÃES CAVATÃO

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde em Análises Clínicas com ênfase em Diagnóstico Especializado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), como proposta de Trabalho de Conclusão de Residência.

ORIENTADOR: Dr. RODRIGO MINUTO PAIVA  
CO ORIENTADOR: Me. EDUARDO WANDAME GOMEZ  
COLABORADORA: Dra. ANA PAULA ALEGRETTI

PORTO ALEGRE - RIO GRANDE DO SUL

2022

## RESUMO

### Introdução

A doença de chagas apresenta um curso clínico bifásico com uma fase aguda e uma fase crônica. Há indicação para transplante de órgãos em indivíduos com a doença. Testes moleculares são ideais para a detecção de casos de reativação parasitária. Este trabalho tem por objetivo realizar a padronização e validação da técnica quantitativa de PCR em Tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação do parasita *Trypanosoma cruzi* em sangue total de pacientes portadores da doença de Chagas.

### Metodologia

Foram incluídos no estudo 10 indivíduos de ambos os sexos e todas as faixas etárias com diagnóstico e/ou pessoas com suspeita de infecção de doença de Chagas. Pacientes sem suspeita ou diagnóstico para doença de Chagas foram excluídos deste estudo, com exceção de algumas amostras utilizadas como controle negativo para o teste. Os pacientes positivos para *T. cruzi* foram selecionadas a partir do exame sorológico de anticorpos IgG.

As amostras de sangue total foram extraídas diretamente utilizando o kit comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Madison, EUA). Para a detecção de *T. cruzi* foi realizada uma qPCR com sonda de hidrólise.

### Resultado e discussão

A eficiência, faixa dinâmica linear, coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e a precisão da qPCR se mostrou satisfatória com diluição seriada de  $4 \log_{10}$  do padrão, ficando com uma inclinação da reta de -3,3, portanto eficiência entre 90 a 110%,  $R^2 \geq 0,98$  e desvio padrão  $\leq 0,250$ . O Limite de Detecção do teste necessita ser testado com mais concentrações. O limite inferior de quantificação ficou em 1,9 cópias/ $\mu\text{L}$  e o limite superior de quantificação em 1.900 cópias/ $\mu\text{L}$ .

### Conclusão

Devido alguns parâmetros ainda necessitar de mais testes, o ensaio de qPCR ainda não pode ser considerado totalmente validado.

**Palavras-chave:** PCR em Tempo Real; qPCR; Validação qPCR, Doença de Chagas, Infecção por *Trypanosoma cruzi*

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, uma antroponose apresenta curso clínico bifásico, isto é, se inicia com uma fase aguda, com a presença do *Trypanosoma cruzi* na corrente sanguínea em intensa atividade, e uma fase crônica que pode se apresentar como indeterminada, cardíaca, digestiva ou cardíaca digestiva (LIDANI, 2019).

Na América Latina, a doença de Chagas é a terceira indicação para transplante cardíaco (NOGUEIRA et al., 2018). Analisando os dados de transmissão da doença de Chagas envolvendo transplantes, verifica-se que é possível haver transplante de rins e fígado com doadores positivos para Chagas, desde que um protocolo de monitoramento rigoroso seja feito após o transplante, a fim de detectar a reativação parasitária precoce (ALTCLAS et al., 2010). Títulos altos no sangue de indivíduos em estágio crônico indicam reativação da doença, sendo que os teste moleculares, por terem alta sensibilidade analítica, são ideais para detecção destes casos (LATTES; LASALA, 2014).

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) consiste em replicar, a partir de um DNA ou cDNA, qualquer sequência nucleotídica de forma seletiva. A técnica consiste na hibridização de oligonucleotídeos iniciadores na fita molde, e um oligonucleotídeo (sonda) marcado com um fluoróforo em uma das fitas, para que uma enzima DNA Taq polimerase possa replicar uma nova fita de forma fiel por repetidos ciclos de amplificação. Um termociclador acoplado a um sistema de detecção de fluorescência é utilizado para aumentar e diminuir a temperatura e detectar o aumento de fluorescência (ALBERTS et al, 2017; FARAH, 2000).

Este trabalho tem por objetivo realizar a padronização e validação da técnica quantitativa de PCR em Tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação do parasita *Trypanosoma cruzi* em sangue total de pacientes portadores da doença de Chagas.



## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos e todas as faixas etárias com diagnóstico de doença de Chagas, e/ou pessoas com suspeita de infecção que apresentaram sinais e sintomas e/ou estavam presentes em área endêmica.

Pacientes sem suspeita ou diagnóstico para doença de Chagas foram excluídos deste estudo, com exceção de algumas amostras utilizadas como controle negativo para o teste. Os dados para análise dos critérios de exclusão foram obtidos a partir do prontuário do paciente.

### **2.2 Amostras clínicas**

Os pacientes positivos para *T. cruzi* foram selecionadas a partir do exame sorológico de anticorpos IgG por Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência realizados na Unidade de Bioquímica Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Para conhecimento dos resultados foi acessado o laudo do exame do paciente através do sistema do hospital.

As amostras clínicas desses pacientes com sorologia IgG positiva para *T. cruzi* foram obtidas a partir de sobras de outros exames que utilizavam sangue total, coletada em tubo EDTA sem gel separador, que seriam descartadas da rotina após a conclusão dos exames.

As amostras com resultado sorológico negativo para doença de Chagas, que compôs o grupo controle deste estudo, foram selecionadas a partir de sobras de amostras, que seriam descartadas da rotina, portanto não havendo a necessidade da aplicação do TCLE.

### 2.3 Processamento e extração das amostras

As amostras de sangue total foram extraídas diretamente utilizando o kit comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Madison, EUA) e o restante da amostra armazenada em freezer -80°C.

As etapas de extração seguiram conforme o protocolo de instruções do fabricante com 200 µL de tampão de lise, 20 µL de proteinase K e 200 µL da amostra (sangue total). A mistura foi aquecida em termobloco a 56 °C por 10 minutos e, posteriormente, adicionado 250 µL do reagente de ligação à coluna de sílica e depois transferido todo o volume para a coluna de sílica, o qual passou por etapas de centrifugação e lavagem da amostra e por fim, a eluição em 60 µL de água fornecida no kit. O material eluído foi armazenado em freezer -80 °C até a realização da PCR em Tempo Real.

### 2.4 Ensaio de PCR em Tempo Real

Para realização do estudo foram utilizados dois sistemas de análise diferentes da PCR em Tempo Real. Para a detecção de *Trypanosoma cruzi* foi feito uma qPCR com sonda de hidrólise, e para detecção do gene humano RNase P foi utilizado intercalante de fita dupla, esse último ensaio já está padronizado na rotina do laboratório e foi utilizado apenas para obter um controle endógeno.

O par de *primers* e sonda específicos de *T. cruzi*, descrito por PIRON et al., foi retirado de uma sequência repetitiva do DNA satélite (satDNA), presente no DNA nuclear, este par de *primers* amplificam uma região de 166 pares de bases. Sendo assim, o *primer forward* corresponde a 5' AST CGG CTG ATC GTT TTC GA 3' (S = G ou C), o *primer reverse* 5' AAT TCC TCC AAG CAG CGG ATA 3' e a sonda 5' CAC ACA CTG GAC ACC AA. A sonda nucleotídica foi marcada na extremidade 5' com o fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína) e na posição 3' com o fluoróforo *quencher*. Para amplificação do alvo foi utilizado o kit Platinum qPCR SuperMix (Invitrogen™). As condições de termociclagem para *T.cruzi* foram: incubação por 2 minutos em temperatura de 50°C para ativar a degradação da UDG, 2 minutos de incubação em 95°C, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 1 minuto.

O segundo ensaio para a determinação do gene humano RNase P utilizando intercalante de DNA, teve como *primer forward* 5' AGA TTT GGA CCT GCG AGC G 3' e *primer reverse* 5' GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT 3'. Para considerar o ensaio como detectado foi utilizada a temperatura de Melting entre 82,36 °C e 84,36 °C. Para amplificação da RNase P foi usado o kit Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen™). As condições de termociclagem foram: incubação por 2 minutos em temperatura de 50°C para ativar a degradação da UDG, 2 minutos de incubação em 95°C, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos, seguido da ciclagem para temperatura de Melting. Este ensaio foi executado consumindo o mesmo material extraído para a análise de *T. cruzi*. O objetivo deste ensaio foi obter um controle endógeno para verificar o sucesso da extração, verificar a existência de substâncias que poderiam inibir a reação de PCR, evitar falsos negativos e verificar a degradação da amostra.

Em todos os ensaios com amostras clínicas dos pacientes para detecção e quantificação do *T. cruzi* foi empregada uma curva padrão realizando uma diluição seriada, razão 1:10, de um controle positivo comercial contendo o genoma completa de *T. cruzi* na concentração de 19.000 cópias/uL, obtendo 5 níveis de concentrações diferentes (1.900 cópias/uL, 190 cópias/uL, 19 cópias/uL, 1,9 cópias/uL e 0,19 cópias/uL). Esta curva foi utilizada para quantificar a carga parasitária nas amostras.

Em todos os ensaios de PCR realizados, tanto para *T. cruzi* quanto para a RNase P foi usado um controle negativo (água isenta de DNase e RNase) para controle de contaminação do ensaio. Além disso, todos os ensaios foram realizados no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

## **2.5 Determinação da concentração de *primers* e sondas**

A fim de determinar a melhor concentração de *primers* e sonda utilizados na reação, primeiramente foi fixada a concentração da sonda em 250 nM e realizado teste com diferentes concentrações para os *primers forward* e *reverse*: 100 nM, 300 nM e 600 nM. Após encontrada a melhor concentração dos *primers*, foi realizado teste com diferentes concentrações para a sonda: 50 nM, 150 nM e 200 nM. O

critério para selecionar a melhor concentração de *primers* e sonda foi através da análise do menor valor de *threshold* (Ct) através da curva de amplificação.

## 2.6 Análise *in silico* de especificidade

A especificidade analítica foi determinada utilizando a ferramenta BLAST. Os *primers forward* e *reverse* e a sonda para *T. cruzi* foram analisados através desta ferramenta, a qual compara a sequência nucleotídica de cada um dos *primers* e sonda com o banco genômico de domínio público, a fim de determinar o alinhamento dessas sequências com outros microrganismos.

## 2.7 Desempenho do ensaio

O desempenho do ensaio foi determinado através da análise das seguintes características: eficiência da PCR, faixa dinâmica linear, coeficiente de correlação, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão.

### 2.7.1 Eficiência de PCR

A eficiência da amplificação da qPCR foi estabelecida diluindo um controle comercial contendo genoma completo de *T. cruzi*, na concentração de  $10^4$  cópias/uL. Uma diluição seriada com 5 pontos de concentração no fator 10x foi realizada.

A eficiência foi estabelecida realizando um gráfico cartesiano plotando no eixo x a concentração inicial do padrão (variável independente) e no eixo y o Ct *cycle threshold* (variável dependente). O Log da inclinação linear da curva determina a eficiência, sendo assim a eficiência é igual a  $(10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ . O máximo teórico de 1,00 (ou 100%) indica que a quantidade de produto dobra a cada ciclo. Foi considerada adequada uma eficiência com valor entre 90% a 110%.

### 2.7.2 Faixa dinâmica linear

Para avaliar adequadamente a eficiência da qPCR a faixa dinâmica cobriu 3 repetições com concentrações de  $5 \log_{10}$  do padrão. Uma inclinação da reta de -3,3

com diferença de 10% para mais ou menos foi aceita. Assim o artefato potencial em uma qPCR de 100% de eficiência foi de apenas 10% para mais ou para menos.

### **2.7.3 Coeficiente de correlação ( $R^2$ )**

Outro parâmetro crítico para avaliar a eficiência da PCR foi o  $R^2$ , que é um termo estatístico que indica quão bom um valor é para prever outro. Quando  $R^2$  é 1, o valor de Y (Ct) pode ser usado para prever com precisão o valor de X (Concentração). Um coeficiente de correlação (valor de  $R^2$ )  $\geq 0,98$  e desvio padrão  $\leq 0,250$  será aceito. (BUSTIN et al., 2009; THERMOFISHER, 2000).

### **2.7.4 Limite de detecção (LOD)**

O LOD foi definido como a concentração mais baixa na qual 95% das amostras testadas foram positivas. A confirmação do LOD foi determinada utilizando oito amostras inoculadas com controle comercial positivo de genoma completo e submetidas à extração. A realização de 20 ensaios com essas amostras em duplicata ou não com apenas 1 sendo negativa foi considerada o LOD (BUSTIN et al., 2009; THERMOFISHER, 2000).

### **2.7.5 Limite de Quantificação (LOQ)**

O LOQ foi definido como o mínimo de concentração de DNA do *Trypanosoma cruzi* o qual todas as réplicas tiveram um resultado positivo para a qPCR com um coeficiente de variação (CV) para o Ct de não mais que 0,5 (BUSTIN et al., 2009).

### **2.7.6 Precisão**

Em uma qPCR 100% eficiente, a diferença de Ct entre duas concentrações sucessivas em uma diluição de 2 vezes é 1. Para poder discriminar entre uma diluição de 2 vezes em mais de 95% dos casos, o desvio padrão deve ser  $\leq 0,250$  (THERMOFISHER, 2000).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Volume de reagentes para qPCR e concentração de *primers* e sonda

Para a realização dos ensaios foi seguido a recomendação de bula para as concentrações dos reagentes, sendo o volume final de reação de 50  $\mu\text{L}$ , Master Mix 25  $\mu\text{L}$ , Rox (1:10) 1  $\mu\text{L}$ , amostra 10  $\mu\text{L}$  e  $\text{H}_2\text{O}$  qsp. Para a análise de todos os resultados foi padronizado um mesmo *threshold* de 0,1 sempre presente na fase exponencial da curva de amplificação.

Para a determinação das concentrações de *primers* e sonda, foi escolhido a concentração que atingiu o maior  $\Delta\text{Rn}$  e menor  $\text{Ct}$ , tanto para os *primers* quanto para a sonda, portanto a melhor concentração para os *primers* forward e reverse foi de 300 nM e a melhor concentração para a sonda foi de 200 nM.

#### 3.2 Eficiência da qPCR, faixa dinâmica linear, coeficiente de correlação e precisão

No primeiro ensaio para verificar o desempenho da qPCR foi realizado uma diluição seriada 1:10 do controle comercial de 19.000 cópias/ $\mu\text{L}$  contendo o genoma completo de *T. cruzi*, com 4 pontos de diluição (1.900 cópias/ $\mu\text{L}$ , 190 cópias/ $\mu\text{L}$ , 19 cópias/ $\mu\text{L}$  e 1,9 cópias/ $\mu\text{L}$ ), cada ponto foi realizado em triplicata.

A eficiência da reação considerando todos os pontos em triplicata foi de 79,756%, inclinação da reta de -3,926,  $\text{R}^2$  de 0,994 e desvio padrão de 0,095. Quando exclui-se o último ponto de diluição de todas as triplicatas obtém o seguinte desempenho: eficiência de 87,046%, inclinação da reta de -3,677,  $\text{R}^2$  de 0,992 e desvio padrão de 0,128. Para uma última análise foi considerada os três primeiros pontos de diluição da primeira e segunda repetição, os resultados foram: eficiência de 93,203%, inclinação da reta de -3,496,  $\text{R}^2$  de 0,999 e desvio padrão de 0,063.

Uma segunda curva foi realizada em simplicata com 6 pontos de diluições (1.900 cópias/ $\mu\text{L}$ , 190 cópias/ $\mu\text{L}$ , 19 cópias/ $\mu\text{L}$ , 1,9 cópias/ $\mu\text{L}$ , 0,19 cópias/ $\mu\text{L}$  e 0,019 cópias/ $\mu\text{L}$ ) partindo do mesmo controle comercial diluídas serialmente na razão 1:10,

obtendo os seguintes resultados: eficiência de 85,324%, inclinação da reta de -3,732,  $R^2$  de 0,995 e desvio padrão de 0,138. Excluindo a última diluição (0,019 cópias/ $\mu$ L) da análise obteve-se uma eficiência de 92,92%, inclinação da reta de -3,504, de  $R^2$  de 0,999 e desvio padrão de 0,064.

### 3.3 Limite de Detecção (LOD)

Para determinar o limite de detecção foi utilizado sangue total de pacientes sabidamente negativos para *Trypanosoma cruzi* e inoculados com controle positivo contendo o genoma completo, as concentrações utilizadas foram 0,1 cópias/ $\mu$ L, 0,01 cópias/ $\mu$ L e 0,001 cópias/ $\mu$ L, a escolha dessas concentrações se deu após uma diluição do controle positivo partindo da concentração de 1 cópia/ $\mu$ L. Todas as concentrações foram positivas, portanto partiu-se do menor valor para realizar o limite de detecção. Foi usado também a concentração de 0,004 cópias/ $\mu$ L com a intenção de obter um Ct anterior, apenas os resultados dos ensaios com o valor de 0,004 cópias/ $\mu$ L encontram-se na tabela abaixo.

**Tabela 1: Resultado Limite de Detecção (LOD)**

ID	Concentração	Resultado		
		Dia 1	Dia 2	Dia 3
Amostra A	0,004 cópias/ $\mu$ L	Detectado (simplicata)	Detectado (duplicata)	
Amostra B	0,004 cópias/ $\mu$ L	Detectado (simplicata)	Detectado (duplicata)	
Amostra C	0,004 cópias/ $\mu$ L	Detectado (simplicata)	Detectado (duplicata)	
Amostra D	0,004 cópias/ $\mu$ L	-	Detectado (triplicata)	

				1 amostra negativa
Amostra E	0,004 cópias/ $\mu$ L	-	-	Detectado (duplicata)
Amostra F	0,004 cópias/ $\mu$ L	-	-	Detectado (duplicata)
Amostra G	0,004 cópias/ $\mu$ L	-	-	Detectado (duplicata) 1 amostra foi negativa
Amostra H	0,004 cópias/ $\mu$ L	-	-	Detectado (duplicata)

### 3.4 Limite de quantificação (LOQ)

Para determinar o limite de quantificação foi realizado uma curva padrão com diluição seriada 1:10 do controle comercial contendo o genoma completo do *T. cruzi*, com 4 pontos de diluição partindo de  $10^4$ . Posteriormente foi utilizado sangue total de pacientes sabidamente negativos para *Trypanosoma cruzi* e inoculados com controle positivo contendo o genoma completo, a fim de atingir as concentrações de: 200,0 cópias/ $\mu$ L, 50,0 cópias/ $\mu$ L, 20,0 cópias/ $\mu$ L e 10,0 cópias/ $\mu$ L. As amostras foram submetidas ao processo de extração e realizada a qPCR com cada concentração em duplicata, os resultados se encontram na tabela abaixo.



Tabela 2: Resultados Limite de Quantificação (LOQ)

Concentração	Resultado quantificado	Cycle threshold (Ct)	Coefficiente de variação (CV)
200 cópias/ $\mu$ L	213 cópias/ $\mu$ L	16,38	0,013
200 cópias/ $\mu$ L	174 cópias/ $\mu$ L	16,69	
50 cópias/ $\mu$ L	46 cópias/ $\mu$ L	18,79	0,008
50 cópias/ $\mu$ L	52 cópias/ $\mu$ L	18,58	
20 cópias/ $\mu$ L	31 cópias/ $\mu$ L	19,40	0,002
20 cópias/ $\mu$ L	32 cópias/ $\mu$ L	19,35	
10 cópias/ $\mu$ L	12 cópias/ $\mu$ L	20,83	0,006
10 cópias/ $\mu$ L	11 cópias/ $\mu$ L	21,01	

Resultado da curva de quantificação: Slope -3,634,  $R^2$  0,999 eficiência de 88,459 e desvio padrão de 0,057.

### 3.5 Amostras clínicas

As amostras clínicas presente na tabela abaixo são de paciente com sorologia IgG positiva para *Trypanosoma cruzi*. O material utilizado para a realização da qPCR foi sangue total em EDTA sem gel separador, as amostras foram obtidas a partir de sobras de amostras de outros exames que seriam descartadas.

Todas as amostras dos pacientes foram testadas para o controle endógeno gene humano RNase P, a fim de verificar o sucesso da extração e a integridade do material genético, todas as amostras foram positivas para o gene humano RNase P.

Em todas as corridas de qPCR, foi realizada uma curva de amplificação e utilizado um controle negativo (água) para verificar ausência de contaminação.

Tabela 4: Resultados com amostras de pacientes

ID	Resultado (Teste em Validação)	Resultado (Laboratório Externo)	Amostra
Amostra 01	Não detectado	Não detectado	Sangue total
Amostra 02	Não detectado	-	Sangue total
Amostra 03	Não detectado	Não detectado	Sangue total
Amostra 04	Não detectado	-	Sangue total
Amostra 05	Não detectado	-	Sangue total
Amostra 06	Não detectado	-	Sangue total
Amostra 07	Não detectado	Não detectado	Sangue total
Amostra 08	Detectado (< LOQ)	-	Sangue total
Amostra 09	Não detectado	-	Sangue total
Amostra 10	Detectado (< LOQ)	Detectado	Sangue total

Espaços com (-) são amostras que não foram enviadas ao laboratório Externo

#### 4. DISCUSSÃO

A fim de obter a maior concentração do DNA genômico extraído e um rendimento com sobra para o ensaio de qPCR, o material genético extraído foi eluído em 60  $\mu$ L de água. O rendimento diminuiu ligeiramente com a redução do volume de eluição, enquanto a concentração aumenta, permanecendo constante a pureza medida por razões de densidade óptica A280/A260 (SMITH et al, 2011).

A região do satDNA é uma região de repetição com 195 pares de bases que possui em torno de  $10^4$  a  $10^5$  cópias por genoma nuclear do *T. cruzi*. A sensibilidade analítica pode variar entre as distintas cepas de *T. cruzi*, principalmente devido aos

diferentes números de cópias de sequências alvo nas diferentes linhagens do parasita, sendo assim a região de amplificação do satDNA faz com que a sensibilidade analítica fique dependente dos diferentes DTU. Uma quantificação por satDNA em cepas TcI e TcIV pode apresentar uma sensibilidade dez vezes mais baixa (FRED et al, 2016). Como o objetivo do trabalho é detectar reativação parasitária precocemente, foi escolhido esta região do DNA nuclear do parasita (satDNA).

Como descrito por ZINGALES et al, 2009 o *Trypanosoma cruzi* possui uma grande variabilidade genética, para tal foi designado seis subgrupos para a classificação de *T. cruzi*, nominado DTU, infelizmente não foi possível a obtenção de cultura ou amostras clínicas de diferentes cepas para a validação do ensaio, isso pode impactar em uma leve variação da quantificação do *T. cruzi* depende da cepa que infecta o paciente.

A eficiência, faixa dinâmica linear, o coeficiente de correlação e precisão da qPCR se mostrou satisfatória com diluição seriada de  $4 \log_{10}$  do padrão, ficando com uma inclinação da reta de -3,3 com diferença de 10% para mais ou menos, coeficiente de correlação (valor de  $r^2$ )  $\geq 0,98$  e desvio padrão  $\leq 0,250$ .

Os testes realizados com a menor concentração encontrada para a determinação do LOD foi com 0,004 cópias/ $\mu\text{L}$ , contudo para ser considerado o LOD apenas uma das amostras testadas poderia ser negativa mas durante os testes duas amostras não foram detectadas. Devido aos recursos financeiros, não foi possível testar novas concentrações para determinar o LOD.

Para determinar o limite de quantificação foi escolhida concentrações dentro dos quatro pontos da curva de calibração do ensaio e cada concentração realizada em duplicata. Todas as concentrações obtiveram um CV (coeficiente de variação) menor que 0,5, sendo todos aprovados, desse modo o limite inferior de quantificação ficou em 1,9 cópias/ $\mu\text{L}$  e o limite superior de quantificação em 1.900 cópias/ $\mu\text{L}$ .

Para o ensaio de precisão a repetibilidade e reprodutibilidade foram satisfatórias com as amostras em duplicata obtendo os mesmos resultados (detectado), a exceção ocorre na repetição do segundo dia da concentração Low, o motivo para isso foi ter usado uma concentração que oscilava perto do Limite de Detecção.

A fim de determinar a sensibilidade e especificidade clínica foram testadas 10 amostras de pacientes com Doença de Chagas crônicas, 8 amostras foram negativas e 2 amostras positivas para *T. cruzi*, sendo apenas uma das amostras positivas realizados qPCR em laboratório externo e obtendo resultado positivo também. Das demais amostras testadas apenas 3 foram enviadas para laboratório externo com resultado não detectado. Devido ao baixo número de amostras clínicas testadas e apenas 4 dessas amostras enviadas para o laboratório de apoio externo não foi possível realizar testes estatísticos sendo uma limitação do trabalho.

## 5. CONCLUSÃO

O método de extração com coluna de sílica se provou eficaz obtendo um rendimento alto e concentrações adequadas para o ensaio. A região de escolha para o desenho de primers e sonda obteve 100% de especificidade através da ferramenta BLAST e sensibilidade compatível com as amostras testadas.

As concentrações de *primers* e sonda para o ensaio se mostraram sem excessos de reagentes ou falta desses. As curvas padrão utilizadas para os ensaios de eficiência e faixa dinâmica linear se mostraram dentro dos valores estipulados, além de uma boa repetibilidade e reprodutibilidade. O limite de detecção com duas amostras não sendo detectadas há a necessidade de testar outras concentrações mais altas. O limite de quantificação se mostrou dentro da faixa dinâmica e com coeficiente de variação adequado para todas as repetições das amostras.

Deste modo, devido ao baixo número de amostras clínicas testadas e apenas 4 dessas amostras enviadas para o laboratório de apoio externo não foi possível realizar testes estatísticos, sendo uma limitação do trabalho. Por fim, é prudente testar mais amostras oriundas de paciente e comparar os resultados com outro laboratório, desta forma o método ainda não pode ser considerado totalmente validado.

## 6. CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores do projeto sob nº CAAE 41033120.4.0000.5327 aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS, declaram não haver conflitos de interesse.

## 7. FINANCIAMENTO

O financiamento para o projeto se deu através do Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE/HCPA)

## 8. REFERÊNCIA

ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**, 6th edição. Artmed Editora, 2017. p. 1464.

ALTCLAS, J. et al. Chagas' Disease and Solid Organ Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 42, n. 9, p. 3354–3359, nov. 2010.

BRASIL, M. S. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Bol Epidemiol**, v. 50, p. 10, 2019.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

FARAH SB. **DNA: segredos & mistérios**. 1ª ed. São Paulo: Sarvier; 1997. p. 276.

FRED, C. Tenover; PERSING, David H.; PERSING, H. **Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice 3rd Edition**. 2016.

LATTES, R.; LASALA, M. B. Chagas disease in the immunosuppressed patient. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 4, p. 300–309, abr. 2014.

LIDANI, Kárita Cláudia Freitas et al. Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. **Frontiers in public health**, v. 7, p. 166, 2019.

NOGUEIRA, S. S. et al. Challenges of immunosuppressive and antitrypanosomal drug therapy after heart transplantation in patients with chronic Chagas disease: A systematic review of clinical recommendations. **Transplantation Reviews**, v. 32, n. 3, p. 157–167, jul. 2018.

PIRON, M. et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta Tropica**, v. 103, n. 3, p. 195–200, set. 2007.

QVARNSTROM, Y. et al. Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, p. e1689, 3 jul. 2012.

SMITH, D. et al. ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System a Novel Column Based Purification of gDNA from Whole Blood. **Promega Corporation Website accessed November**, v. 14, p. 2012, 2011.

THERMOFISHER. Real-time PCR: understanding Ct. **Communication**, n. C, p. 1–6, 2000.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, nov. 2009.

## 8. ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho será desenvolvido de acordo com os princípios de ética em pesquisa, conforme Resolução 466/2012 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Os pesquisadores se comprometem a preservar a privacidade dos participantes do estudo cujos dados serão coletados em prontuário ou base de dados, assim como informações institucionais ou material biológico armazenado. Concordam igualmente, que estes materiais ou informações serão utilizados única e exclusivamente para execução do presente projeto e que os resultados serão divulgados sem a identificação dos participantes. Este estudo se limitará à padronização e validação da detecção e quantificação do DNA do protozoário *Trypanosoma cruzi* em sangue periférico e suas correlações clínicas.

Este estudo prevê coleta adicional de material biológico e a utilização do mesmo material da rotina de análise dos pacientes e banco de amostras de conveniência. Desta forma, solicita-se aquisição do TCLE.

Os riscos envolvidos neste projeto são mínimos. Os participantes poderão sofrer o desconforto da coleta de sangue periférico e há o risco de quebra de confidencialidade. No entanto, para minimizar este risco, os pesquisadores assinarão o termo de compromisso para utilização de dados e comprometem-se em manter o sigilo dos dados. Embora a pesquisa não proporcione benefícios imediatos ao participante, os resultados e a participação no estudo poderão contribuir para que o conhecimento das relações de reativação parasitária possa ser utilizado como medida de antecipação do tratamento do paciente, bem como contribuir para um melhor manejo da doença. Além disso, será mantido completo sigilo sobre a identificação dos pacientes envolvidos no estudo. Ademais, neste primeiro momento, os resultados deste estudo não serão utilizados na rotina assistencial, bem como não estarão implicados em mudança no tratamento destes pacientes, uma vez que se limita à validação das metodologias propostas.

## 9. REFERÊNCIAS

- ALTCLAS, J. et al. Chagas' Disease and Solid Organ Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 42, n. 9, p. 3354–3359, nov. 2010.
- ANDRADE, J. P. DE et al. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 97, n. 2 Suppl 3, p. 1–48, 2011.
- ANTONIO WALTER FERREIRA, S. DO L. M. No title. In: **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 496.
- ALBERTS, Bruce et al. Analisando células, moléculas e sistemas. In: **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Artmed Editora, 2017. p. 1464.
- BROEDERS, S. et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 37, n. 2, p. 115–126, jun. 2014.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.
- CARLOS PINTO DIAS, J. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, jun. 2016.
- Centers for Disease Control and Prevention. CDC, 30 de Abr. 2019. American Trypanosomiasis. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>>. Acesso em: 08 de set. de 2020.
- DAVID H. PERSING, ET AL. Molecular Approaches for Diagnosis of Chagas' Disease and Genotyping of *Trypanosoma cruzi*. In: PERSING et al. (Eds.). **Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice**. 3. ed. [s.l.] American Society of Microbiology, 2016. p. 835.
- DE OLIVEIRA, A. B. B. et al. Parasite–Vector Interaction of Chagas Disease: A Mini-Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 653–655, 7 mar. 2018.
- FARAH, S. B. **DNA Segredos e Mistérios**. 1. ed. São Paulo: Sarvier, 1997. p. 276.
- GUSTAVO GONÇALVES. **Atividade anti *Trypanosoma cruzi* de *Pogonopus tubulosus* e *Ocotea lancifolia***. [s.l.] Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul, 2017.
- JORGENSEN, J. H. **Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition**. 11. ed. [s.l.] American Society of Microbiology, 2015.
- JULIANA VIEIRA FERREIRA NAME. **Interação *Trypanosoma cruzi* e hospedeiro: influência do parasita na expressão da subunidade  $\beta$ 1i do imunoproteassoma**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2017.
- LATTES, R.; LASALA, M. B. Chagas disease in the immunosuppressed patient. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 4, p. 300–309, abr. 2014.
- LEWIS, M. D. et al. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1305–1317, out. 2009.
- LIDANI, K. C. F. et al. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Frontiers in**



**Public Health**, v. 7, n. 6, p. 1–13, 2 jul. 2019.

MATTOS, E. C. **Associação de métodos para detecção de Trypanosoma cruzi em alimentos**. [s.l.] Secretaria da Saúde, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico**, v. 50, p. 10, 2019.

MORAES, A. S. **Dinâmica das integrações de minicírculos de kDNA de Trypanosoma Cruzi no genoma hospedeiro**. [s.l.] Universidade de Brasília, 24 mar. 2016.

MOREIRA, O. C. et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor Trypanosoma cruzi parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. **Acta Tropica**, v. 125, n. 1, p. 23–31, jan. 2013.

NAVES, L. S. **Estudo do ciclo intracelular de Trypanosoma cruzi e a sua relação com a atividade de compostos antichagásicos**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2018.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Blast, 18 de Jun. 2020. Página inicial. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 08 de set. de 2020.

NOGUEIRA, S. S. et al. Challenges of immunosuppressive and antitrypanosomal drug therapy after heart transplantation in patients with chronic Chagas disease: A systematic review of clinical recommendations. **Transplantation Reviews**, v. 32, n. 3, p. 157–167, jul. 2018.

PERSING et al. (EDS.). Molecular Approaches for Diagnosis of Chagas' Disease and Genotyping of Trypanosoma cruzi. In: **Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice**. 3. ed. [s.l.] American Society of Microbiology, 2016. p. 835.

PIERROTTI, L. C. et al. Chagas Disease Recommendations for Solid-Organ Transplant Recipients and Donors. **Transplantation**, v. 102, n. 2S, p. S1–S7, fev. 2018.

PIRON, M. et al. Development of a real-time PCR assay for Trypanosoma cruzi detection in blood samples. **Acta Tropica**, v. 103, n. 3, p. 195–200, set. 2007.

QVARNSTROM, Y. et al. Sensitive and Specific Detection of Trypanosoma cruzi DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, p. e1689, 3 jul. 2012.

RAJÃO, M. A. et al. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in Trypanosoma cruzi. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309–321, maio 2014.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583–588, dez. 2006.

SEIRINGER, Peter et al. Comparison of four PCR methods for efficient detection of Trypanosoma cruzi in routine diagnostics. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 88, n. 3, p. 225–232, 2017.

SILVA, G. H. DA. **Moléculas envolvidas na invasão de células de mamíferos por Trypanosoma cruzi: uma revisão de literatura**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

SINGH, C.; ROY-CHOWDHURI, S. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. In: RAJYALAKSHMI LUTHRA, RAJESH SINGH, K. P. (Ed.). **Clinical Applications of PCR**. [s.l.: s.n.]. p. 161–176.

**TAP-HCPA: Tamanho de Amostra e Poder do teste, uma ferramenta voltada a pesquisadores da área da saúde.** [s. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://hcpa-unidade-bioestatistica.shinyapps.io/TAP-HCPA>. Acesso em: 18 de Set. 2020.

THERMOFISHER. Real-time PCR: understanding Ct. **Communication**, n. C, p. 1–6, 2000.

TOLEDO, D. A. M. et al. Lipid Body Organelles within the Parasite *Trypanosoma cruzi*: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160433, 4 ago. 2016.

Universidade Federal do Acre. UFAC, 17 de jun. 2019. UFAC realiza pesquisas com vetores da doença de Chagas. Disponível em: [https://docs.google.com/document/d/16X4\\_-8hXpEbZ7\\_vOC5\\_WaX3sQCOeGYksKDFk2K16WdA/edit](https://docs.google.com/document/d/16X4_-8hXpEbZ7_vOC5_WaX3sQCOeGYksKDFk2K16WdA/edit). Acesso em: 08 de set. de 2020.

WHO. **Control of Chagas Disease** *Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*. Geneva: [s.n.]. Disponível em: [https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/S0035-9203\(02\)90338-X](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/S0035-9203(02)90338-X).

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, nov. 2009.

## 10. ANEXO

### 10.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS

**Nº do projeto GPPG 2020-0548**

Título do Projeto: Validação De Metodologia Analítica Para Quantificação De *Trypanosoma Cruzi* Através Da Técnica Molecular De PCR

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é introduzir uma técnica para detectar e monitorar o parasita da doença de Chagas no sangue. Esta pesquisa está sendo realizada pela Unidade de Diagnóstico Especializado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar o convite, sua participação na pesquisa envolverá uma coleta adicional de sangue periférico. Serão coletados 4 mL de sangue para a pesquisa (equivalente a 1 colher de chá). O material biológico coletado será armazenado de

forma codificada. A amostra de sangue será utilizada apenas para fins desta pesquisa. O restante da amostra que não for utilizada no projeto será descartada.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são desconforto em razão do maior tempo de permanência da agulha ou possibilidade de outra coleta. A coleta de sangue poderá causar hematoma (mancha roxa) que deverá desaparecer em alguns dias.

A pesquisa não trará benefícios imediatos ao participante. Contudo, poderá contribuir para o aumento do conhecimento sobre o monitoramento do parasita no sangue para acompanhar o tratamento e transplante, visando melhorar a eficiência desses procedimentos.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você receberá ou poderá vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Rodrigo Minuto Paiva, pelo telefone (51) 98431-1919, pesquisador Fernando Guimarães Cavatão, pelo telefone (51) 99104-0741, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, email [cep@hcpa.edu.br](mailto:cep@hcpa.edu.br) ou no 2º andar do HCPA, sala 2229, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

---

Nome do participante da pesquisa

---

Assinatura

---

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

---

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

## 10.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS

Nº do projeto GPPG 2020-0548

Título do Projeto: Validação De Metodologia Analítica Para Quantificação De *Trypanosoma Cruzi* Através Da Técnica Molecular De PCR

A pessoa pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é introduzir uma técnica para detectar e monitorar o parasita da doença de Chagas no sangue. Esta pesquisa está sendo realizada pela Unidade de Diagnóstico Especializado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você autorizar, a participação na pesquisa envolverá uma coleta adicional de sangue periférico. Serão coletados 4 mL de sangue para a pesquisa (equivalente a 1 colher de chá). O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. A amostra de sangue será utilizada apenas para fins desta pesquisa. O restante da amostra que não for utilizada no projeto será descartada.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são desconforto em razão do maior tempo de permanência da agulha ou possibilidade de outra coleta. A coleta de sangue poderá causar hematoma (mancha roxa) que deverá desaparecer em alguns dias.

A pesquisa não trará benefícios imediatos ao participante. Contudo, poderá contribuir para o aumento do conhecimento sobre o monitoramento do parasita no sangue para acompanhar o tratamento e transplante visando melhorar a eficiência desses procedimentos.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar, ou ainda, desistir da participação e retirar sua autorização, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que a pessoa receberá ou poderá vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da participação na pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome ou da pessoa pela qual você é responsável não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Rodrigo Minuto Paiva, pelo telefone (51) 98431-1919, pesquisador Fernando Guimarães Cavatão, pelo telefone (51) 99104-0741, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, email cep@hcpa.edu.br ou no 2º andar do HCPA, sala 2229, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

---

Nome do participante da pesquisa

---

Assinatura

---

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

---

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_