

**LÚCIA MARIA ALMEIDA BRAZ**

**Comparação da Reação em Cadeia da  
Polimerase com o exame microscópico na  
detecção do *Trypanosoma cruzi* em  
amostras procedentes do trato digestório do  
*Triatoma infestans***

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

Área de Concentração: Pediatria  
Orientadora: Profa. Dra. Thelma Suely Okay

São Paulo

2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Braz, Lúcia Maria Almeida

Comparação da Reação em Cadeia da Polimerase com o exame microscópico na detecção do *Trypanosoma cruzi* em amostras procedentes do trato digestório do *Triatoma infestans* / Lúcia Maria Almeida Braz. -- São Paulo, 2006.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientadora: Thelma Suely Okay.

Descritores: 1.Doença de Chagas/diagnóstico 2.Reação em Cadeia da Polimerase  
3.Microscopia 4.Trypanosoma cruzi 5.Conteúdo gastrointestinal 6.Triatoma

USP/FM/SBD-151/06

## **DEDICATÓRIA**

**àqueles que são a razão do meu viver:**

**minha mãe Isaura,** “*aquela mulher que faz a escalada da montanha da vida removendo pedras e plantando flores*” (Cora Coralina)

**meu marido Celso,** *por todo o amor*

**meus filhos Celso Daniel e Rafael Alexandre,** *pela alegria diária*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*À Profa. Dra. Thelma Suely Okay pela valiosa orientação, por todo o apoio científico e estímulo.*

*Ao querido Roberto Raiz Júnior (in memorian) pela co-orientação e amizade. “Obrigada, pela pessoa bonita que você era!”*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Vicente Amato Neto por ter me introduzido no LIM-36 - ICR, pelo estímulo, apoio e compreensão.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Shikanai-Yassuda por todo o estímulo.

Ao Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira pelo apoio.

Às funcionárias e alunos do LIM-36 pelo apoio e amizade, em especial: à farmacêutica Gilda Maria Bárbara Del Negro pela revisão do texto, à bióloga Lídia Yamamoto pelo auxílio no preparo dos géis, fotos e tabelas, à secretária Maria Luisa Nunes pelas sugestões e à Dra. Sofia Mizuho Miura Sugayama.

À Ruth Semira Alárcon e à Érika Gakiya, biólogas do LIM 46, pelo auxílio nos exames microscópicos e pela amizade.

Aos funcionários do IMT-USP: Almir Robson Ferreira e Maria Iranides Santana de Oliveira por todo o apoio no preparo dos gráficos, tabelas, fotografias e conferência bibliográfica e pela inestimável amizade e encorajamento.

À bióloga Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro do IMT-USP pela doação dos anestésicos e das cepas de *Leishmania*, e pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Ulysses Doria Filho pela análise estatística.

À Profa. Dra. Sônia Regina Testa da Silva Ramos pelas sugestões na aula de qualificação.

Ao Prof. Dr. Silvino Alves de Carvalho pelo incentivo e pelas sugestões ao texto desta tese.

Ao Prof. Dr. José Maria Soares Barata pela doação dos triatomíneos e sugestões na aula de qualificação.

Ao Prof. Dr. Evandro Roberto Baldacci pelas sugestões na aula de qualificação.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior pelo estímulo e à médica-veterinária Luciana Regina Meireles pela doação dos anestésicos.

Ao Prof. Dr. Paulo César Cotrim pela doação das cepas de *Leishmania*.

À Profa. Dra. Marta Teixeira do ICB-USP pela doação da cepa de *T. rangeli*.

À bióloga do INCOR Rosemeire Aparecida Silva por minha apresentação à biologia molecular e pela amizade.

Ao biólogo da FMUSP Marcelo Alves Ferreira, pelas sugestões ao texto na língua inglesa.

À Hertha Bárbara Wullerth Telles de Souza por minha iniciação científica.

Às secretárias do Departamento e do ICR: Denize Terezinha Costa, Solange Ribollo Bastieri Serôdio e Adriana Trindade Bezerra, e à Sra. Mariza Kazue Umetsu Yoshikawa, da biblioteca do ICR.

Aos meus irmãos e irmãs por todo o carinho.

O apoio de todos foi fundamental para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**LISTA DE SÍMBOLOS**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELAS**

**RESUMO**

**SUMMARY**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>2</b>  |
| 1.1 Formas de transmissão da doença de Chagas.....   | 4         |
| 1.2 Fases da doença de Chagas .....  | 7         |
| 1.3 Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas .....   | 9         |
| 1.4 Comparação da PCR com o xenodiagnóstico, hemocultura, exame microscópico e técnicas sorológicas, na análise de amostras sanguíneas.....          | 13        |
| 1.5 Comparação da PCR acoplada ao exame microscópico realizado no âmbito do xenodiagnóstico, na análise de amostras procedentes de triatomíneos..... | 17        |
| <b>2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>3. HIPÓTESE DO ESTUDO.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>   | <b>23</b> |
| 4.1 Objetivo geral.....  | 24        |
| 4.2 Objetivos específicos.....   | 24        |
| <b>5. ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO.....</b>   | <b>26</b> |
| <b>6. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>28</b> |
| 6.1 Procedência dos triatomíneos.....  | 29        |
| 6.2 Procedência da cepa Y do <i>T. cruzi</i> .....   | 30        |
| 6.3 Procedência dos camundongos Balb/C.....  | 30        |



|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 6.4       | Protocolo de infecção dos camundongos, com a cepa Y, do <i>T. cruzi</i> .....   | 31 |
| 6.5       | Protocolo de alimentação dos triatomíneos nos camundongos Balb/C, infectados com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> e em controles.....          | 32 |
| 6.6       | Definição dos períodos de exame dos triatomíneos por EM e PCR.....  | 33 |
| 6.7       | Triatomíneos, EM, PCR e falso-positivo.....   | 33 |
| 6.8       | Exame Microscópico (EM) das amostras procedentes do tubo digestório....   | 34 |
| 6.9       | Protocolo de extração do DNA do <i>T. cruzi</i> das amostras procedentes do tubo digestório de triatomíneos.....                          | 34 |
| 6.10      | Medidas preconizadas para a realização da PCR.....  | 35 |
| 6.11      | Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores.....  | 36 |
| 6.12      | Protocolo da PCR em amostras procedentes do tubo digestório..   | 37 |
| 6.13      | Teste de Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da seqüência TCZ.....   | 38 |
| 6.14      | Fase 1 - Modelo de Alta Parasitemia.....  | 39 |
| 6.15      | Fase 2 - Modelo de Baixa Parasitemia.....   | 41 |
| 6.16      | Análise Estatística.....  | 43 |
| <b>7.</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | 44 |
| 7.1       | Análise de amostras procedentes do tubo digestório.....   | 45 |
| 7.2       | Amplificação do fragmento de 144 pares de base.....   | 45 |
| 7.3       | Teste de especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores da seqüência TCZ.....   | 46 |
| 7.4       | Análise estatística dos resultados obtidos após a triplicata.....   | 49 |
| 7.5       | Resultados da 1ª Fase – Modelo de Alta Parasitemia.....   | 50 |
| 7.6       | Resultados da 2ª Fase – Modelo de Baixa Parasitemia.....  | 56 |
| <b>8.</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | 61 |
| 8.1       | Amostras de material biológico obtido do tubo digestório dos triatomíneos: definição da análise individual versus análise de “pool” ..... | 62 |
| 8.2       | Extração de DNA para a PCR.....   | 63 |
| 8.3       | Extração de DNA para a PCR e inibidores da amplificação.....  | 64 |
| 8.4       | PCR: comparação do DNA nuclear com o cinetoplástico.....  | 67 |
| 8.5       | PCR nas amostras negativas.....   | 68 |
| 8.6       | Teste de Especificidade com os oligonucleotídeos iniciadores da seqüência TCZ do <i>T. cruzi</i> .....                                    | 69 |
| 8.7       | Triplicata da PCR.....  | 70 |
| 8.8       | Comparação do EM com a PCR (DNA cinetoplástico comparado com o DNA nuclear).....  | 71 |
| 8.9       | Comparação da PCR com o EM na Alta e na Baixa Parasitemia.....  | 75 |
| 8.10      | Concordância da PCR com o EM na Alta e na Baixa Parasitemia – Vantagens e desvantagens da PCR e do EM.....                                | 76 |
| 8.11      | Avaliação da realização da PCR de acordo com os tempos após o xenodiagnóstico – Importância da precocidade da realização dos exames.....  | 77 |
| <b>9.</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 81 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>10. ANEXOS</b> .....   | 83  |
| Anexo A Exame direto para o diagnóstico do <i>T. cruzi</i> após concentração por micro-hematócrito e QBC.....   | 84  |
| Anexo B Diagnóstico do <i>T. cruzi</i> após multiplicação em meio LIT – Hemocultura.....  | 85  |
| Anexo C Técnicas sorológicas para o diagnóstico da doença de Chagas (Hemaglutinação Indireta, Imunofluorescência Indireta e ELISA).....   | 86  |
| Anexo D Gene Bank – Resultados do “Blast” para o <i>T. rangeli</i> .....  | 88  |
| Anexo E Gene Bank – Resultados do “Blast” para a <i>L. amazonensis</i> .....  | 89  |
| Anexo F Gene Bank – Resultados do “Blast” para a <i>L. braziliensis</i> .....   | 90  |
| Anexo G Gene Bank – Resultados do “Blast” para a <i>L. chagasi</i> .....  | 91  |
| Anexo H Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Alta Parasitemia – Comparação da PCR SIMPLES com a PCR em TRIPLICATA – 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 60º dia..... | 92  |
| Anexo I Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Baixa Parasitemia – Comparação da PCR SIMPLES com a PCR em TRIPLICATA – 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º, 15º, 20º 25º, 30º e 60º dia..... | 93  |
| Anexo J Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Alta Parasitemia – Comparação do EM com a PCR – TEMPOS PRECOCES .....   | 94  |
| Anexo K Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Alta Parasitemia – Comparação do EM com a PCR – TEMPOS INTERMEDIÁRIOS.....  | 95  |
| Anexo L Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Alta Parasitemia – Comparação do EM com a PCR – TEMPOS TARDIOS.....   | 96  |
| Anexo M Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Baixa Parasitemia Comparação do EM com a PCR – TEMPOS PRECOCES.....   | 97  |
| Anexo N Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Baixa Parasitemia – Comparação do EM com a PCR – TEMPOS INTERMEDIÁRIOS.....   | 98  |
| Anexo O Teste Estatístico – Teste de McNemar – Grupo de Baixa Parasitemia – Comparação do EM com a PCR – TEMPOS TARDIOS.....  | 99  |
| <b>11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 100 |

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

