



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECIOSAS**

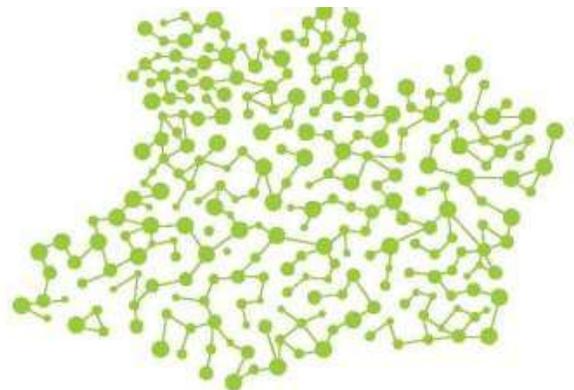


**PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS EM PACIENTES COM
CARDIOPATIA SEM ETIOLOGIA DEFINIDA AUTÓCTONES DA AMAZÔNIA
BRASILEIRA**

JESSICA VANINA ORTIZ

MANAUS

2019



JESSICA VANINA ORTIZ

**PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS EM PACIENTES COM
CARDIOPATIA SEM ETIOLOGIA DEFINIDA AUTÓCTONES DA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do título de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientador (a): Prof. Dr. João Marcos Bemfica Barbosa Ferreira

Co-orientador (a): Prof. Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra

MANAUS

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

APRESENTAÇÃO:

Ortiz, Jessica Vanina

Prevalência da doença de Chagas em pacientes com cardiopatia sem etiologia definida autóctones da Amazônia Brasileira (Dissertação). Jessica Vanina Ortiz. Orientador João Marcos Bemfica Barbosa Ferreira- Manaus, 2018.
viii. 174f.

Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Medicina Tropical – Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas

Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, 2019.

Inclui bibliografia

Orientador(a): Ferreira, João Marcos Bemfica Barbosa

Coorientador(a): Guerra, Jorge Augusto de Oliveira

1. Doença de Chagas crônica. 2. Insuficiência cardíaca. 3. Cardiomiopatia chagásica. 4. Região Amazônica.

I. Ferreira, João Marcos Bemfica Barbosa (Orient.). II. Guerra, Jorge Augusto de Oliveira (Coorient.).

III. Universidade do Estado do Amazonas.

IV. . Prevalência da doença de Chagas em pacientes com cardiopatia sem etiologia definida autóctones da Amazônia Brasileira

FOLHA DE JULGAMENTO

**PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS EM PACIENTES
COM CARDIOPATIA SEM ETIOLOGIA DEFINIDA
AUTÓCTONES DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

JESSICA VANINA ORTIZ

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Prof. Dr. João Marcos Bemfica Barbosa Ferreira

Prof. Dr. Aristóteles Comte de Alencar Filho

Prof.^a Dra. Leíla Inês de Aguiar Raposo da Câmara Coelho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os indivíduos que fizeram parte deste estudo, assim como, aos mais de 6 milhões de pessoas que vivem com a doença Chagas em todo o mundo e aos mais de 1 milhão que convivem com a forma cardíaca desta patologia. Dedico esta investigação a todos os indivíduos que convivem com alguma patologia cardíaca e que desconhecem a sua causa e lutam todos os dias contra ela.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcelo Raul Ortiz e Hilda Esther Morinigo Ortiz, pelos ensinamentos de vida, pelo árduo investimento na minha educação e formação, pelo amor e apoio incondicional que recebo a cada dia.

À minha família, pelo incentivo a continuar em busca do que me faz bem e feliz, por serem partícipes das minhas conquistas pessoais e profissionais.

À Gabriela Maciel, pelo companheirismo e apoio nestes anos e durante esta trajetória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Marcos Bemfica Barbosa Ferreira, pela atenção e dedicação constante, pelos ensinamentos que comigo levarei, e pela acolhida nesta jornada. Meu muito obrigada!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra, pelo auxílio e ensinamentos para a execução exitosa deste trabalho.

À Prof.^a Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, pelo acolhimento no laboratório, pelas orientações e conselhos, essenciais para o meu amadurecimento profissional.

Ao Prof. Dr. Norival Kesper Júnior e Rafael Ávila, pela disposição em auxiliar e ensinar as técnicas *in house*, em especial do TESA blot, fundamental para este projeto.

Ao Prof. Dr. Henrique Silveira e MSc. George Allan Villarouco da Silva, pela colaboração e ensinamentos sobre as técnicas moleculares.

À Prof.^a Dra. Leíla Inês de Aguiar Raposo da Câmara Coelho e MSc. Susan Smith, pelos ensinamentos e ajuda na realização das técnicas sorológicas.

À Débora Raysa, pela amizade, ensinamentos e ajuda constante na execução das técnicas moleculares.

À Auxiliadora Chiarion, Evelyn Vaz e Luiz Maciel, pelo auxílio nas coletas em vários momentos durante o desenvolvimento deste projeto.

À MSc. Kátia Couceiro, pela ajuda em diversos aspectos, pela colaboração, pelos ensinamentos e pelos conselhos que muito contribuíram para minha formação.

Aos funcionários do Centro de Entomologia, Yolanda Noguth, Silvana Arakian, Flávio Fé e em especial, ao Sr. Nelson Fé, pelo aprendizado adquirido nestes dois anos de convivência.

Ao Grupo de Pesquisa em Doença de Chagas e Leishmaniose, Kenny, Rubens, Sabrina, Arineia, Maurício, Lucas, Denison, Emily, Laylah, Mônica, Elsa, Dr. Grafe e Dra. Silvia. Obrigada por serem presentes e pela ajuda de todos os dias.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, em especial à turma de Mestrado – Ano 2017, pela agradável convivência e aprendizado nesta trajetória.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação, Dona Conceição Tufic e Iza Freitas, pela disposição em sempre ajudar os alunos.

À Universidade do Estado do Amazonas, pela oportunidade na formação acadêmica.

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, pela estrutura e apoio no desenvolvimento de trabalhos científicos.

Ao Hospital Universitário Francisca Mendes, pelo suporte na execução deste trabalho.

A todos que aqui citei e a todos que contribuíram indiretamente para que este projeto fosse executado com êxito, meus sinceros agradecimentos.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento e concessão da bolsa de pesquisa.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento desta pesquisa.

RESUMO

A manifestação crônica cardíaca da doença de Chagas (DC) recebe o nome de cardiopatia chagásica crônica (CCC), é a causa mais grave de miocardiopatia dilatada quando comparada com outras etiologias, o que representa um problema sério de saúde pública e econômico em todo mundo. Na Amazônia Brasileira, pouco se conhece sobre o real perfil epidemiológico da CCC, além da constante dificuldade que vem se enfrentando no diagnóstico sorológico da fase crônica de DC. O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência da doença de Chagas em pacientes com miocardiopatia dilatada sem etiologia definida na região da Amazônia Brasileira. Para isso, foram avaliados pacientes provenientes do Ambulatório de Miocardiopatias do Hospital Universitário Francisca Mendes no período de 12 meses (Julho de 2017 a Julho de 2018). Os indivíduos incluídos no estudo são autóctones da Amazônia, que relataram nunca terem viajado para outras regiões do Brasil e com histórico epidemiológico de risco para a DC, como habitação em área rural, hábito de entrar na mata, consumo de frutos de palmeiras e/ou carne de caça. Amostras de sangue periférico foram coletadas e submetidas a dois métodos sorológicos iniciais, ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFI), e um teste confirmatório, o *western Blot* (TESA blot). Foram incluídos 45 indivíduos com miocardiopatia dilatada a esclarecer, destes, 14 amostras de soro foram reativas no ELISA (n=1) ou na IFI (n=13) e então, submetidas ao TESA blot, no qual nenhuma foi reativa. Com isso, não foi possível confirmar o diagnóstico de DC nesse grupo de pacientes. Este estudo, portanto, demonstra as dificuldades de diagnóstico da CCC na região amazônica e a necessidade de novas pesquisas com a perspectiva de melhora na acurácia diagnóstica da DC na nossa região.

Palavras Chaves: Doença de Chagas crônica. Insuficiência cardíaca. Cardiomiopatia chagásica. Região Amazônica.

ABSTRACT

Chagas disease' (CD) chronic manifestation is known as Chagas cardiomyopathy (CCM) and implicates in long-term morbidities, representing worldwide health and economic concern. In the Brazilian Amazon region, the epidemiological profile of this condition is not well elucidated, along with a remaining difficulty of diagnosis of chronic CD. The aim of this study was to evaluate the prevalence of CD in patients with dilated cardiomyopathy of unknown etiology in the Brazilian Amazon region. For it, we evaluated patients attended at cardiomyopathy service of the Francisca Mendes University Hospital in Manaus, Amazonas from July, 2017 to July, 2018. All individuals included in the study were natural from any State belonging to the Brazilian Amazon region with no previous history of travelling to any other Brazilian region and had epidemiological risk factors such as living in rural areas, habit to enter the jungle, consumption of palmeira's fruits and/or meat of wild mammals. Peripheral blood samples were subjected to two primary serological methods, enzymatic-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence (IIF), and one confirmation method, western blotting using TESA (TESA blot). We recruited 45 individuals with dilated cardiomyopathy of unknown etiology, in which 14 serum samples were reactive to ELISA (n=1) or IIF (n=13) and then, subjected to TESA blot testing, to which none came up reactive. Thus, we were not able to confirm diagnosis of CD in any of the individuals. This study demonstrates the diagnostic difficulties of Chagas cardiomyopathy in the Amazon region and the need for new research with the perspective of improving the diagnostic accuracy of Chagas disease in our region.

Keywords: Chronic Chagas disease. Heart failure. Chagas Cardiomyopathy. Brazilian Amazon.

RESUMO LEIGO

A doença de Chagas (DC) é transmitida pelas fezes do inseto barbeiro. A DC pode passar anos sem apresentar sintomas e quando é descoberta, muitas vezes é por algum problema no coração, popularmente conhecido como “coração grande”. Essa forma da doença é conhecida como cardiopatia chagásica crônica, e por ser grave, causa preocupação em todo o mundo. Na Amazônia Brasileira, são poucos os trabalhos com relação a quantos casos dessa doença existem na região e por isso, a importância deste estudo, que tem como objetivo tentar descobrir mais casos de DC em pacientes que tem o “coração grande” e não sabem a causa. Foram incluídas todas as pessoas atendidas no Ambulatório de Miocardiopatias do Hospital Universitário Francisca Mendes e que apresentaram as características: nascidas e criadas em algum dos estados da região amazônica e nunca tenham viajado para outros estados brasileiros, expostas à região de mata, trabalhado com agricultura, seringueira ou pesca, por exemplo. Foram coletadas amostras de sangue para três tipos de exames que recebem o nome de: ELISA, IFI e *western blot*. Foram incluídos 45 pacientes com a doença do coração grande sem causa definida de julho de 2017 a julho de 2018. No exame ELISA, uma amostra de sangue foi positiva, no exame de IFI, cinco foram positivas e oito ficaram indeterminadas. Assim, nas 14 amostras de sangue com resultados inconclusivos foi feito o teste chamado de *western blot* para tentar confirmar o diagnóstico. Nenhum paciente foi diagnosticado com doença de Chagas neste estudo, e com isso, não foi possível encontrar uma causa para a doença do coração desse grupo de pacientes. Desta forma, continua o questionamento sobre como essa doença afeta a população da região amazônica, assim como a tentativa de diagnosticar a doença de Chagas na sua forma crônica.

Palavras Chaves: Doença de Chagas crônica. Insuficiência cardíaca. Cardiomiopatia chagásica. Região Amazônica.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 – Mapa da distribuição global da doença de Chagas, 2006-2015. Fonte: WHO, 2017.

Fig. 2 – Formas morfológicas do *Trypanosoma cruzi*. (A) Epimastigota; (B) Tripomastigota metacíclico; (C) Tripomastigota sanguíneo; (D) Amastigota. Fonte: Adaptado de Chagas, 1909.

Fig. 3 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. (A) Nos hospedeiros vertebrados durante o ciclo silvestre e o ciclo doméstico; (B) Nos hospedeiros invertebrados. Fonte: Adaptado por Ortiz, 2018.

Fig. 4 – Distribuição geográfica das linhagens do parasito (TcI-TcVI) na América Latina. Fonte: Adaptado de Brenière, 2016 e Zingales, 2017

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

- CCC – Cardiopatia chagásica crônica.
- DC – Doença de Chagas.
- DNA – Ácido desoxirribonucleico.
- DTU – Unidade Discreta de Tipagem.
- ECG – Eletrocardiograma.
- ECO – Ecocardiograma transtorácico.
- ELISA – Ensaio imunoenzimático.
- FEVE – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo.
- HAI – Hemaglutinação indireta.
- IC – Insuficiência cardíaca.
- IFI – Imunofluorescência indireta.
- kDa – Quilo Dalton
- IL-10 – Interleucina 10.
- INF- γ – Interferon gama.
- LIT – *Liver Infusion Trypatose*.
- MCD/MDI – Miocardiopatia dilatada/idiopática.
- MDA - Administração de medicamentos em massa.
- mg/kg – Miligramas por quilogramas.
- NYHA – *New York Heart Association*.
- OMS – Organização Mundial da Saúde.
- PCR – Reação em cadeia da polimerase.
- T. cruzi*/Tc – *Trypanosoma cruzi*.
- TESA – *Trypomastigote Excreted-Secreted Antigen*.
- TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa.
- WB – *Western Blot*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas	1
1.1.1. Conceito, transmissão e epidemiologia	1
1.1.2. Patologia	3
1.1.3. Diagnóstico	4
1.1.4. Tratamento	6
1.1.5. Perfil epidemiológico da doença de Chagas na Amazônia	6
1.2. O parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.2.1. Características e ciclo evolutivo	8
1.2.2. Ciclo biológico no hospedeiro invertebrado e vertebrado	9
1.2.3. Diversidade genética e distribuição geográfica	11
1.3. Aspectos gerais da cardiopatia chagásica crônica	13
1.3.1. Conceito e epidemiologia	13
1.3.2. Apresentação clínica	14
1.3.3. Fisiopatologia	16
1.3.4. Diagnóstico e tratamento	17
1.3.5. O cenário na Amazônia Brasileira	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Geral	20
2.2. Específicos	20
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	21
3.1. Manuscrito científico redigido conforme normas da revista escolhida para submissão.	21
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS	33
5. CONCLUSÃO	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
7. ANEXOS	40
7.1. Anexo 1	40
7.2. Anexo 2	80
7.3. Anexo 3	80
7.4. Anexo 4	81
7.5. Anexo 5	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas

1.1.1. Conceito, transmissão e epidemiologia

Em 1906, Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, médico sanitário, entrou na equipe de Manguinhos (mais tarde nomeado Instituto Oswaldo Cruz), no Rio de Janeiro. Em 1907, Oswaldo Cruz colocou Carlos Chagas no comando da campanha profilática antimalárica em Minas Gerais, desta forma, mudando-se para a cidade de Lassance em 1909⁽¹⁾.

A criança, Berenice, foi a primeira paciente em que Carlos Chagas conseguiu identificar o parasito, para o qual deu o nome de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem ao seu mentor, Oswaldo Cruz. Chagas descreveu todas as características da nova doença, identificou seu agente etiológico, sua morfologia e seu ciclo biológico, além dos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes afetados. Posteriormente, em sua homenagem, a doença recebeu o nome de doença de Chagas (DC)^(1,2).

Apesar dos inúmeros estudos já realizados em seus 109 anos de descoberta, a DC ainda permanece na lista das dezessete doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS). Essas doenças podem ser prevenidas com o controle vetorial, o tratamento disponível e com campanhas de administração de medicamentos em massa (MDA)⁽³⁾.

A DC pode ser transmitida por diversas vias, sendo a vetorial, a forma clássica; a oral, a forma de transmissão emergente; a transfusional/transplante de órgãos; a vertical (congenita) e a acidental⁽⁴⁾.

A transmissão vetorial ocorre através das fezes dos insetos hematófagos, de hábitos noturnos, chamados de triatomíneos, que após a picada e consequente alimentação, tornam-se pesados e incapazes de se locomoverem, os obriga a

defecarem no local da picada e desta forma, inoculando o parasito na corrente sanguínea do hospedeiro⁽⁵⁾.

A transmissão por via oral ocorre pela ingestão de alimentos contaminados e tem sido associada à ocorrência de surtos da doença aguda, sendo o primeiro relato feito em 1968, na cidade de Teutônia, no Rio Grande do Sul. Porém, o maior número de casos de transmissão tem ocorrido na região Amazônica⁽⁶⁻⁸⁾.

Os riscos para a transmissão por transfusão de sangue e transplante de órgãos em que um indivíduo infectado transmite para o outro, estão na presença do parasito no sangue ou componente transfundido, assim como, no estado imunológico do paciente receptor e na qualidade da triagem dos candidatos à doação⁽⁴⁾.

A transmissão vertical ocorre na passagem do parasita da mãe para o filho. A prevalência desta via varia significativamente de 1% a 40%, em que o Brasil apresenta uma estimativa de 0,02%. Já a transmissão acidental, ainda que muito rara, pode ocorrer em pessoas que trabalham em laboratórios com triatomíneos infectados, ações de captura de vetores, infecção cirúrgica ou coleta de sangue⁽⁴⁾.

Devido as diversas formas de transmissão, a DC é considerada um grande problema de saúde publica e de importante investigação global nos últimos anos devido ao aumento do fluxo migratório. Segundo a OMS, 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, destes, mais de 5 milhões são indivíduos da América Latina. No Brasil, o número é aproximado a 1,6 milhão (Fig. 1)^(4,5).

Acredita-se que um número aproximadamente 400 mil casos de infecções ocorram em países não-endêmicos⁽⁹⁾. Os casos registrados nos Estados Unidos da América, Canadá, Europa e Japão tem sido em imigrantes procedentes da América Latina. A prevalência de infecção em imigrantes latino-americanos nos Estado Unidos é de 1,2% e na Europa, 4,2%^(10,11). Na Espanha, onde os estudos são mais frequentes, *Abras et*

al. (2017)⁽¹²⁾ mostraram uma prevalência de 27%, enquanto que *Perez et al. (2016)*⁽¹³⁾ mostraram 70% de infecção pelo *T. cruzi* em imigrantes.

Somando o número de casos não diagnosticados e não tratados estima-se de que aproximadamente 75 milhões de pessoas estejam sob risco de adquirir a doença⁽⁵⁾.

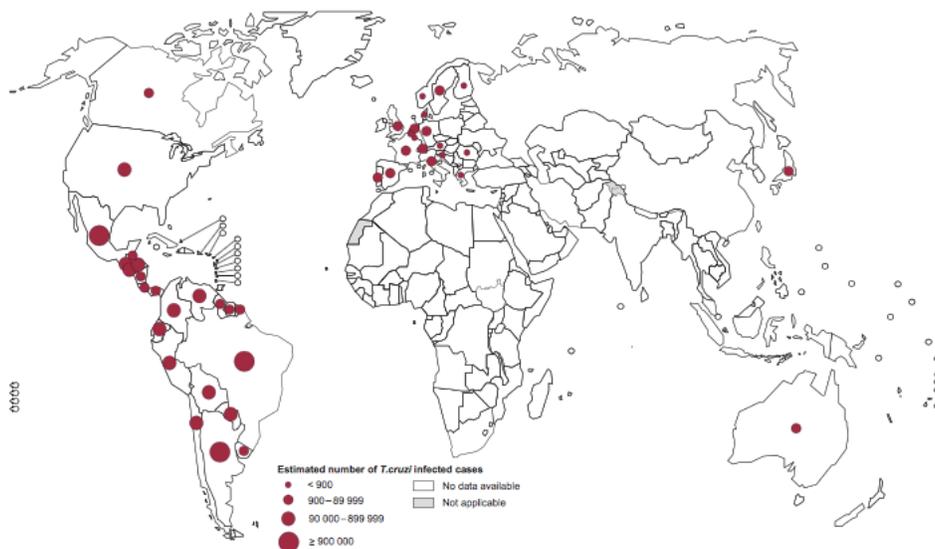


Fig. 1 – Mapa da distribuição global da doença de Chagas, 2006-2015. Fonte: WHO, 2017.

1.1.2. Patologia

A DC apresenta clinicamente duas fases: uma fase aguda e uma crônica. A fase crônica pode ser subdividida em: crônica indeterminada, na ausência de alterações cardíacas ou digestivas; crônica cardíaca e crônica digestiva.

A fase aguda é caracterizada pelo aparecimento de sintomas inespecíficos como febre e calafrios, tem duração de 6 a 8 semanas, onde é possível detectar as formas flageladas do *T. cruzi* devido à alta parasitemia. A infecção aguda provoca reações inflamatórias locais tais como conjuntivite e edema palpebral unilateral, chamada de sinal de Romaña, assim como lesões nodulares no local da picada do vetor, conhecida

como Chagoma de inoculação e miocardite, podendo o eletrocardiograma (ECG) ou o ecocardiograma (ECO) apresentar alterações⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

A fase crônica indeterminada apresenta baixa parasitemia, exames sorológicos positivos, porém ausência de sintomas e de manifestações cardíacas ou digestivas. Esta fase pode durar anos devido à estratégia endógena exercida pela imunidade celular a fim de manter os parasitos sob controle^(4,15).

Após anos da forma indeterminada, 20-35% dos pacientes, a depender da sua localização geográfica, podem desenvolver insuficiência cardíaca, fenômenos tromboembólicos, lesões irreversíveis do sistema nervoso autônomo cardíaco⁽¹⁷⁾, arritmias ventriculares⁽¹⁸⁾, parada cardíaca e evoluir para uma morte súbita⁽¹⁹⁻²¹⁾. E cerca de 10% apresentam algum tipo de alteração do trato digestivo como disfagia ou hemorragia digestiva⁽⁴⁾.

1.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico da DC utiliza do exame clínico e de exames complementares parasitológicos diretos e/ou indiretos, sorológicos, cardiológicos e de biologia molecular, a depender da forma clínica. De modo geral, para a fase aguda predomina o uso de exames parasitológicos diretos de pesquisa do parasito circulante na corrente sanguínea devido à alta parasitemia. O padrão ouro é a gota espessa, corada com o Giemsa⁽⁴⁾.

Em contrapartida, para a fase crônica, por apresentar baixa parasitemia, são utilizados métodos sorológicos para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* (IgG) circulantes no sangue periférico. A recomendação da OMS é realizar dois métodos diferentes para confirmar a doença. São usados métodos de alta sensibilidade como o ensaio imunoenzimático (ELISA), a imunofluorescência indireta (IFI) e a hemaglutinação indireta (HAI), combinando com métodos de alta especificidade como o *western blot* (WB) e reação em cadeia de polimerase (PCR)^(4,22).

Os testes de ELISA são considerados de triagem por apresentarem um alto grau de sensibilidade. As placas de 96 poços são sensibilizadas com antígenos totais ou recombinantes de *T. cruzi*. A técnica de escolha é o método indireto, que busca detectar anticorpos anti-*T. cruzi* em amostras de soro ou plasma de pacientes com suspeita de infecção pelo parasito, através da utilização de um segundo anticorpo conjugado com uma enzima, em que esta na presença de substratos específicos são capazes de gerar produtos coloridos, os quais são quantitativamente analisados por espectrofotometria. A cada reação, os valores do ponto de corte, o *cut-off* são calculados e a partir deles, as amostras podem ser consideradas reagentes ou não-reagentes⁽²³⁾.

Os testes de IFI fazem uso de formas epimastigostas de *T. cruzi*, as quais são fixadas em lâminas onde será feita a reação com as amostras de soro ou plasma do indivíduo com suspeita da infecção. Os anticorpos que estiverem presentes na amostra serão revelados por um segundo anticorpo conjugado com fluoresceína, observada a fluorescência em microscópio específico, dá-se o resultado de reagente⁽²²⁾.

O método de *western blotting* foi desenvolvido a partir de extrato das formas tripomastigotas do *T. cruzi*. O antígeno extraído semipurificado recebe o nome de TESA (*Trypomastigote Excreted-Secreted Antigen*) e contém em sua estrutura diversos componentes específicos liberados pelo parasito, por isso torna-se um método muito utilizado como confirmatório em amostras inconclusivas. Os componentes migram para regiões entre 150-160 kDa⁽²⁴⁾.

Exames parasitológicos indiretos como o xenodiagnóstico e a hemocultura, apesar de apresentarem baixa sensibilidade na fase crônica, também podem ser feitos. O xenodiagnóstico foi proposto inicialmente por Brumpt, em 1914, método que se baseia na utilização de ninfas de triatomíneos para investigar a infecção pelo parasita. Coura et al. (1991)⁽²⁵⁾ detectou em 50% dos pacientes, a presença do *T. cruzi*. A hemocultura consiste em semear sangue periférico diretamente em meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose) e logo, visualizar a presença do parasito em microscópio óptico invertido. A detecção varia de 0 a 94%^(26,27).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular usada como método complementar, em pesquisa, de detecção de DNA de *T. cruzi*. Tem elevada especificidade, sendo possível a identificação genotípica do parasito⁽²⁷⁾.

1.1.4. Tratamento

Para o tratamento da DC existem dois medicamentos, o nifurtimox e o benznidazol. O nifurtimox é considerado um fármaco com maior frequência de reações adversas do que o benznidazol (85% vs. 53%), sendo este último o único disponível no Brasil para uso e a sua administração segue o estabelecido nas diretrizes brasileiras e latino-americanas: 5-7mg/kg por 60 dias. Nos casos agudos diagnosticados por gota espessa, o tratamento é de início imediato⁽⁴⁾.

Para os casos crônicos, critérios para o tratamento foram estabelecidos já que existe divergência quanto a real eficácia do benznidazol para este grupo de pacientes. Os critérios para administração de antiparasitário são^(4,28):

- I. Crianças \leq 12 anos (I – A);
- II. Adolescentes entre 13-18 anos e adultos com infecção crônica, quando se consegue estabelecer que a fase aguda ocorreu até 12 anos (IIa – C);
- III. Indivíduos entre 19-50 anos, deve ser considerado de forma individualizada: indeterminada (IIa – B), sem cardiopatia avançada (IIa – C);
- IV. Mulheres em idade fértil, para reduzir a transmissão congênita;
- V. Não é recomendado para pacientes com cardiopatia avançada (III – C).

1.1.5. Perfil epidemiológico da doença de Chagas na Amazônia

A região Amazônica foi por muito tempo considerada uma área não endêmica para a doença de Chagas. Porém, nas duas últimas décadas, esse perfil vem mudando com o aumento dos casos registrados, tanto de agudos quanto de crônicos

O primeiro caso de DC na sua forma aguda foi relatado em 1969, no Pará⁽²⁹⁾. E no estado do Amazonas, em 1980 por *França et al.*⁽³⁰⁾ Quanto aos primeiros registros

de pacientes sorologicamente positivos, ocorreram em 1977⁽³¹⁾. E desde então, programas de vigilância e inquéritos sorológicos vem sendo realizados⁽³²⁻³⁴⁾.

Ainda que a transmissão por via vetorial ocorra, um novo perfil epidemiológico nos estados da Amazônia vem se destacando, que é o aumento dos casos agudos por infecção oral associado ao consumo de alimentos regionais contaminados e responsáveis pela ocorrência de vários surtos⁽³⁵⁻³⁷⁾. No Amazonas, seis surtos já foram notificados desde 2004, em Tefé. Seguidos por registros em Coari (2007), Santa Izabel do Rio Negro (2010), Carauari (2011 e 2015), e mais recentemente, em 2018, no município de Lábrea^(38,39).

A fase crônica, na região Amazônica, apresenta uma baixa prevalência comparado aos demais estados, onde a doença é endêmica (Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Pernambuco). O Inquérito Nacional de 1975 a 1980 demonstrou uma soroprevalência de 0-2,39% nos estados pertencentes à Amazônia Legal⁽³²⁾. No Amazonas, Coura et al.⁽²⁵⁾ vem realizando desde 1991 inquéritos sorológicos na região do Alto Rio Negro, onde registrou-se prevalências variando de 9,1 a 13,7%^(40,41). Já em áreas rurais da cidade de Manaus, de Coari e de Tefé, a prevalência registrada é de 1,2%⁽⁴²⁾.

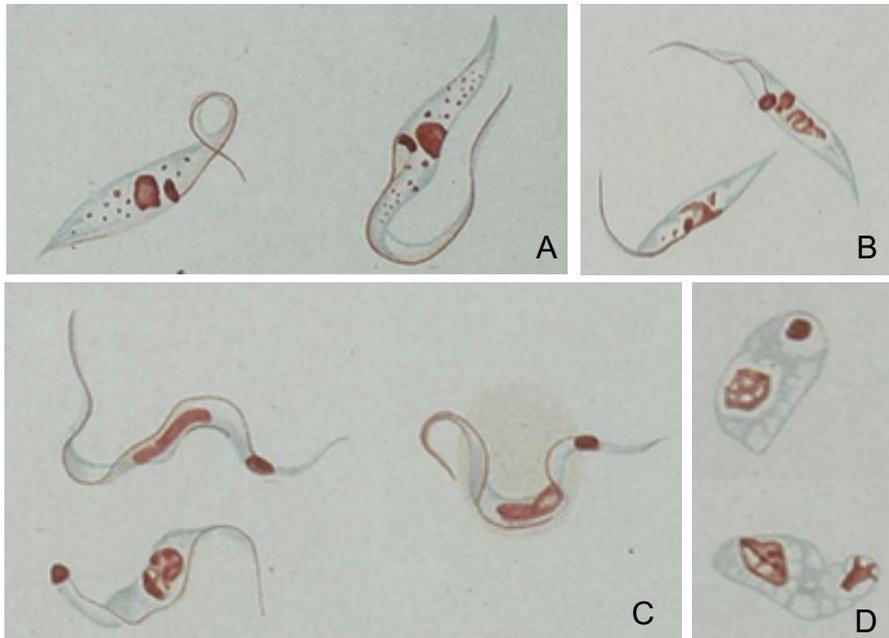
A morbidade da DC na Amazônia é menor quando comparada com as regiões endêmicas⁽³³⁾. No entanto, é um alerta o número crescente de casos agudos, que de certo modo, podem evoluir para uma doença crônica, evento este que já foi registrado no Amazonas. Além disso, esses casos agudos ao acometerem crianças que são mais susceptíveis a sintomas graves com risco maior de complicações, podem causar meningoencefalite^(43,44).

1.2. O parasito *Trypanosoma cruzi*

1.2.1. Características e ciclo evolutivo

O agente etiológico identificado por Carlos Chagas em 1909 recebeu inicialmente o nome *Schizotrypanum cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Posteriormente, denominado *Trypanosoma cruzi*⁽²⁾.

O *T. cruzi* é um protozoário que apresenta um único flagelo, um cinetoplasto e uma estrutura presente na mitocôndria que carrega o DNA. Durante seu ciclo evolutivo, o parasito



apresenta diversas formas de acordo com o hospedeiro em que se encontra⁽¹¹⁾.

Os epimastigotas são as formas encontradas no intestino dos triatomíneos; os tripomastigotas metacíclicos são as formas infectantes presentes nas fezes desses insetos; os tripomastigotas sanguíneos estão presentes no sangue periférico do hospedeiro vertebrado; e os amastigotas, que são as formas imóveis alojadas nos tecidos do hospedeiro (Fig. 2)^(2,11).

Fig. 2 – Formas morfológicas do *Trypanosoma cruzi*. (A) Epimastigota; (B) Tripomastigota metacíclico; (C) Tripomastigota sanguíneo; (D) Amastigota. Fonte: Adaptado de Chagas, 1909⁽²⁾.

1.2.2. Ciclo biológico no hospedeiro invertebrado e vertebrado

O hospedeiro invertebrado é estritamente hematófago, popularmente conhecido como barbeiro. Devido à implementação de programas de controles da transmissão da doença de Chagas, o Brasil, foi considerado, pelas organizações internacionais, livre do seu principal vetor, o *Triatoma infestans*, no ano de 2006⁽⁴⁵⁾.

Os triatomíneos pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, e somam 142 espécies, destas, no Brasil, estão presentes 62, e 39 (63%) são encontrados exclusivamente no Brasil. A sua distribuição é ampla no país, presentes em todos os biomas^(46,47).

Segundo o Ministério da Saúde, dentre as 62 espécies distribuídas nos espaços do intradomicílio e peridomicílio no Brasil, destacam-se como espécies de relevância epidemiológica: *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus lutzi*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius nasutus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius pictipes*, *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma rubrofasciata*, *Triatoma sordida* e

Triatoma vitticeps⁽⁴⁾.

Na Amazônia, são encontradas 16 espécies, sendo 10 já encontradas infectadas pelo *T. cruzi*. Em 2009, Fé et al.⁽⁴⁷⁾ coletaram triatomíneos em áreas rurais e urbanas de Manaus para avaliação de infecção natural, pertencentes às espécies *Rhodnius robustus*, *Rhodnius pictipes* e *Panstrongylus geniculatus*, de modo geral, a taxa de infecção natural foi de 6,1% e não houve nenhum indício de colonização domiciliar^(46,48).

Desta forma, em seu hospedeiro invertebrado, o *T. cruzi* na forma tripomastigota invade o tubo digestivo e sofre alterações bioquímicas e morfológicas transformando-se em epimastigotas. Na necessidade de repasto sanguíneo, o triatomíneo sai à noite em busca de alimento, que ao encontrar o homem, seu hospedeiro vertebrado, o infecta através de suas fezes contaminadas com as formas tripomastigotas metacíclicas⁽¹¹⁾.

Já no novo hospedeiro, o vertebrado, o *T. cruzi* atravessa as células superficiais e invade a corrente sanguínea, ali, ocorre a mudança para a forma tripomastigota sanguínea que ao encontrar células lisas, miocárdicas ou neurais invadem-nas transformando-se em formas imóveis, as amastigotas. Estas, irão se reproduzir e perduram por toda a vida no hospedeiro (Fig. 3)⁽¹⁵⁾.

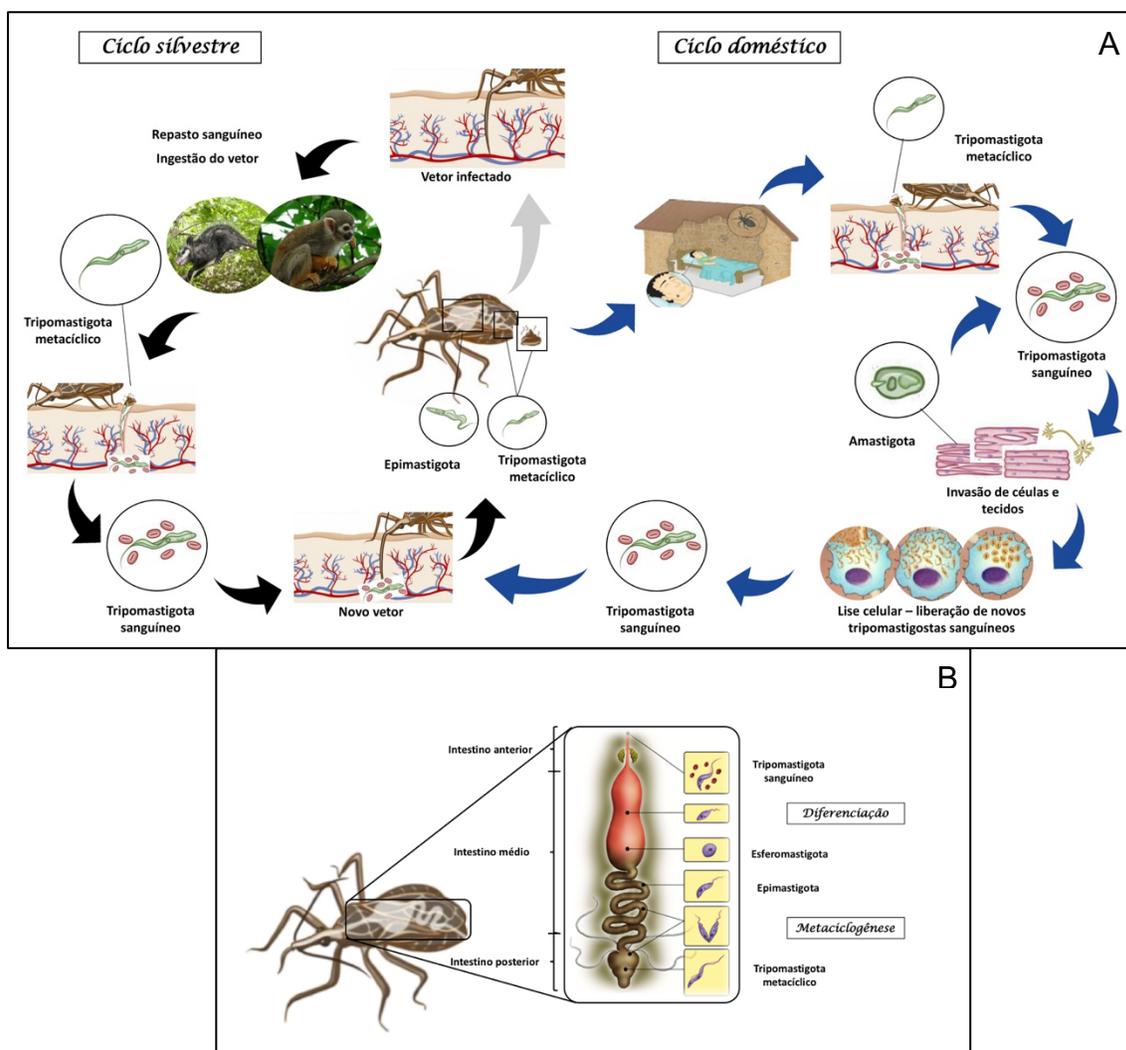


Fig. 3 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. (A) Nos hospedeiros vertebrados durante o ciclo silvestre e o ciclo doméstico; (B) Nos hospedeiros invertebrados. Fonte: Adaptado por Ortiz, 2018.

1.2.3. Diversidade genética e distribuição geográfica

A dinâmica do parasito em seus hospedeiros invertebrados e vertebrados é associada à sua diversidade genética e as consequentes diferenças na morbimortalidade, manifestações clínicas e epidemiológicas da DC ⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾.

Inicialmente, a classificação das linhagens do *T. cruzi* baseava-se em dois grandes grupos: *T. cruzi I* e *T. cruzi II*. Após vários anos e avanços no conhecimento genotípico

do parasito, uma nova classificação em “unidades discretas de tipagem” (DTU) foi proposta, com a divisão em seis DTUs (TcI- TcVI)⁽⁵¹⁾. As DTUs são descritas como sendo um conjunto de estoques geneticamente mais relacionados uns com os outros do que com qualquer outro estoque e que são identificáveis por um marcador genético, molecular e imunológico comuns (Fig. 4)⁽⁵²⁾.

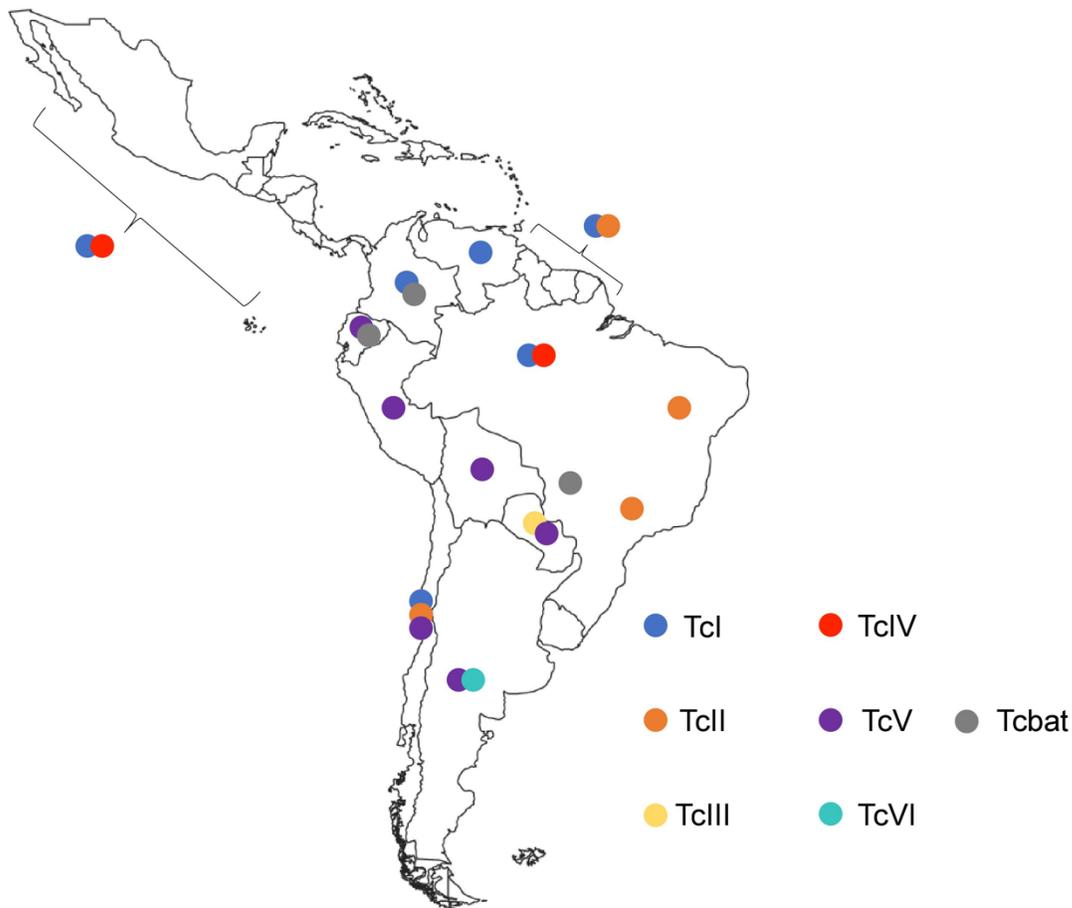


Fig. 4 – Distribuição geográfica das linhagens do parasito (TcI-TcVI) na América Latina. Fonte: Adaptado de Brenière, 2016 e Zingales, 2017^(49,52).

Vários estudos têm relacionado as linhagens com a fase da doença, a fim de encontrar associações no desencadeamento de sintomas. Assim, para a forma aguda, no Amazonas, foram identificadas as linhagens TcI e TcIV em pacientes com infecção oral^(53,54). Para a fase crônica, foi identificada a linhagem TcII em áreas endêmicas do

Brasil, de TcI, na Colômbia e no Amazonas e TcV, na Espanha, em pacientes imigrantes provenientes da Bolívia, Paraguai e do Equador.⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾.

Tais investigações ajudam a mapear a distribuição das linhagens do *T. cruzi* e procuram associar às diferentes formas clínicas, prognóstico e tratamento a fim de melhor compreender essa dinâmica de alta complexidade exercida pelo parasito⁽⁵³⁾.

1.3. Aspectos gerais da cardiopatia chagásica crônica

1.3.1. Conceito e epidemiologia

A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é uma das formas crônicas de apresentação da doença de Chagas em que se evidenciam alterações eletrocardiográficas e/ou ecocardiográficas. Caracteriza-se frequentemente como uma miocardiopatia dilatada (MCD), em que a inflamação crônica provoca uma destruição tissular progressiva e fibrose miocárdica, por arritmias cardíacas, distúrbios do sistema de condução cardíaco, ou por alterações menos graves com alterações apenas eletrocardiográficas⁽¹⁴⁾.

A MCD é por definição, segundo a OMS, uma dilatação e um prejuízo da contração do ventrículo esquerdo⁽⁵⁸⁾. Pode ser causada por fatores genéticos, tóxicos, por doenças autoimunes, endócrinas e infecciosas, ou até mesmo consideradas idiopáticas quando a sua etiologia não pode ser esclarecida. A miocardiopatia dilatada idiopática (MDI) é definida como uma dilatação cardíaca e disfunção sistólica sem evidências de doença coronariana, doença valvar, congênita ou doença hipertensiva não compensada. A incidência da MDI é de 17,9/100.000 habitantes na população, em geral^(59,60).

A CCC é a maior causa de morte entre pacientes com miocardiopatia não-ischêmica na América Latina. Estima-se de que aproximadamente 30% dos pacientes com a doença de Chagas venham a desenvolver alguma alteração cardíaca⁽¹⁴⁾.

A OMS estima um número aproximado a 1,1 milhão de pessoas vivendo com a cardiopatia chagásica em todo o mundo, destas, 232 mil são residentes brasileiros. A CCC é responsável pela elevada carga de morbimortalidade, com grande impacto econômico e social^(4,5).

Em estudos de análise de prognóstico, foram identificadas quatro importantes variáveis usadas para a estratificação de risco: (1) classe funcional III/IV da *New York Heart Association* (NYHA); (2) cardiomegalia; (3) disfunção sistólica do ventrículo esquerdo; e (4) taquicardia ventricular não sustentada⁽⁶⁰⁾. Anteriormente, Rassi et al. (2006) já haviam estabelecido um escore de risco de mortalidade na CCC visto que há evidências de um pior prognóstico em pacientes com miocardiopatia dilatada de etiologia chagásica em relação às outras etiologias, quando em presença desses fatores⁽⁶¹⁻⁶⁴⁾.

Os estudos de prevalência da doença de Chagas em pacientes com cardiopatia idiopática ou não-isquêmica ainda são escassos. Em uma população de imigrantes latino-americanos com miocardiopatia dilatada em Nova Iorque foi encontrado 13% de infecção pelo *T. cruzi* ⁽⁶⁵⁾ e em Los Angeles, 19% entre pacientes com miocardiopatia não-isquêmica⁽⁶⁶⁾. No Brasil, na cidade do Rio de Janeiro, em uma população de internados com diagnóstico de cardiopatia de qualquer etiologia foi encontrado 0,5% de sororreatividade para a doença de Chagas⁽⁶⁷⁾.

1.3.2. Apresentação clínica

As manifestações clínicas da CCC são agrupadas em três síndromes: (1) insuficiência cardíaca; (2) arritmias e (3) tromboembolismo. O diagnóstico é dado a partir de alterações encontradas no eletrocardiograma e/ou ecocardiograma⁽⁴⁾.

A classificação clínica quanto ao grau de envolvimento cardíaco é dada a partir de critérios, como descritos na Tabela 1^(4,14).

Tabela 1 – Classificação clínica do comprometimento miocárdico na cardiopatia chagásica crônica.

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
A	Forma indeterminada. Sem manifestações digestiva.
B1	Cardiopatia estrutural. Alterações no eletrocardiograma. Sem disfunção ventricular global (FEVE $\geq 45\%$) nem sinais de insuficiência cardíaca.
B2	Cardiopatia estrutural. Com disfunção ventricular global (FEVE $< 45\%$), porém sem sinais atuais de insuficiência cardíaca.
C	Cardiopatia estrutural. Com disfunção ventricular global e insuficiência cardíaca compensável (NYHA I-IV).
D	Cardiopatia estrutural. Com insuficiência cardíaca refratária. Necessidade de intervenção especializada (NYHA IV).

A insuficiência cardíaca (IC) é o estado final de muitas doenças cardíacas, ela é frequente mundialmente com aproximadamente 26 milhões de adultos convivendo com esta doença. No Brasil, cerca de 6,5 milhões de pessoas sofrem de IC. Dentre as outras causas fora a doença de Chagas estão a doença isquêmica, hipertensão arterial, as doenças pulmonares, a doença coronariana, a doença valvar e a febre reumática⁽⁶⁸⁾.

A CCC é a causa líder de IC sistólica crônica em áreas endêmicas para a DC. A etiologia chagásica da IC acomete de 4 a 8% dos pacientes ambulatoriais. O estudo BREATHE, I Registro Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, mostrou uma prevalência de 11% da doença de Chagas em pacientes com IC descompensada, sendo a quarta etiologia mais frequente. A região Norte apresentou 6,7%, sendo todos os pacientes provenientes do Pará, pois o estado do Amazonas não foi avaliado nesse estudo⁽⁶⁹⁾.

A forma arritmogênica é caracterizada por uma frequência cardíaca irregular, causada pelo acúmulo de células mortas no tecido cardíaco que desencadeia alterações na condução elétrica. A CCC é considerada uma das miocardiopatias mais

arritmogênicas e taquicardias supraventriculares podem ocorrer, assim como, fibrilação atrial e arritmias ventriculares^(18,70).

A ocorrência de tromboembolismo, recentemente vem sendo considerada como uma forma importante de manifestação e associada ao maior risco de acidente vascular encefálico neste grupo de pacientes, e é associado à disfunção sistólica, aumento do volume atrial esquerdo, aneurisma apical e trombose mural intracardíaca⁽⁷¹⁾.

1.3.3. Fisiopatologia

O *T. cruzi* tem tropismo por células cardíacas, sendo o coração órgão sede de inflamação crônica causada pelas formas amastigotas do parasito. As alterações ocorrem nas três camadas do coração, em consequência desse fato, as alterações que surgem em conjunto formam o quadro anatomopatológico da cardiopatia⁽⁷²⁾.

Estudos sobre essas alterações demonstraram que o bloqueio de ramo direito, assim como o bloqueio divisional anterossuperior são mais frequentes em pacientes com doença de Chagas na forma crônica cardíaca. Da mesma forma, aumento das câmaras cardíacas, fração de ejeção abaixo de 55% e alterações segmentares do tipo acinesia ínfero-lateral são encontrados nesses pacientes. O que caracteriza a cardiopatia chagásica quando em investigação⁽¹⁵⁾.

Fundamentalmente, há quatro mecanismos implicados à patogênese CCC: (1) a inflamação tissular causada pela presença do parasito; (2) distúrbios microcirculatórios; (3) mecanismos imunopatológicos e (4) disautonomia cardíaca⁽⁷¹⁾.

A inflamação crônica persistente pela presença do parasito, em sua forma amastigota, induz uma infiltração de linfócitos com citotoxicidade específica nas fibras miocárdicas, perda celular e fibrose, fatores estes relacionados com uma severidade maior e um pior prognóstico da IC na CCC^(73,74).

A presença de microtrombos e microespasmos, disfunção endotelial e aumento da atividade plaquetária caracterizam os distúrbios microcirculatórios também descritos presentes na CCC. Acredita-se que essas alterações sejam consequências da inflamação ou mediadas por fatores imunológicos, e provoquem hipoperfusão em áreas miocárdicas levando à formação de aneurismas apicais nas paredes do ventrículo esquerdo^(14,71).

Após a intensa atuação imunológica durante a fase aguda, em que a parasitemia é alta, e tentativa de manter o parasito sob controle durante a fase crônica indeterminada, reações patogênicas de autoimunidade por mimetismo molecular e ativação policlonal ocorrem na CCC. Esses mecanismos provocam aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ e TNF- α) e diminuição de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), o que sustenta as hipóteses de que a evolução para a CCC desenvolve uma resposta imune exacerbada do tipo Th1^(71,75).

A ocorrência tanto patológica quanto funcional de denervação cardíaca provoca uma regulação autonômica cardíaca anormal, com depopulação neuronal predominante no sistema nervoso parassimpático^(75,76). Níveis de adipocitocinas, mediadores produzidos pelo tecido adiposo, são associados com parâmetros de avaliação do sistema nervoso autônomo. Os distúrbios neurogênicos contribuem de forma importante no desenvolvimento de arritmias malignas e morte súbita⁽¹⁷⁾.

1.3.4. Diagnóstico e tratamento

A cardiopatia chagásica crônica tem seu diagnóstico a partir da epidemiologia positiva, anamnese, exame físico, alterações eletrocardiográficas, radiológicas e sorológica⁽¹⁴⁾.

As alterações presentes no eletrocardiograma com maior frequência são: alteração de repolarização ventricular, bloqueio de ramo direito, bloqueio divisional anterossuperior, bloqueios atrioventriculares e arritmias. No ecocardiograma

transtorácico, observa-se a fração de ejeção reduzida, alterações segmentares e lesões apicais⁽⁷⁰⁾.

Quanto ao tratamento da CCC, a terapia farmacológica para as manifestações cardíacas é essencial seguindo as devidas diretrizes. Porém, o tratamento da doença de Chagas mostra-se um comportamento secundário e à critério do profissional. Há evidências de que o uso de beta bloqueadores na IC confere uma proteção aos pacientes chagásicos apesar do tratamento etiológico^(14,77).

Ainda que divergente, a conduta quanto ao tratamento com antiparasitários para os pacientes com CCC, deve ser levada em consideração. O estudo multicêntrico BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) avaliou a eficácia e a segurança do benznidazol em pacientes com CCC e demonstrou que o tratamento, apesar de reduzir a parasitemia, não reduz de forma significativa a evolução clínica nem a mortalidade após cinco anos⁽⁷⁸⁾.

1.3.5. O cenário na Amazônia Brasileira

Na região Amazônica, o perfil clínico-epidemiológico da cardiopatia chagásica difere um pouco do que é possível observar em outras regiões, principalmente de zonas endêmicas.

Os primeiros relatos de miocardiopatia dilatada de etiologia chagásica ocorreu em 2003, sendo dois casos fatais⁽⁷⁹⁾. Logo, em 2006, Xavier et al.⁽⁸⁰⁾ descreveram três novos casos. Em 2009, mais três casos autóctones foram diagnosticados⁽⁸¹⁾. A presença de aneurisma apical, assim como a ocorrência de acidente vascular cerebral já foram relatados no estado do Amazonas^(82,83).

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado em parceria com o centro de referência em Cardiologia da região, o Hospital Universitário Francisca Mendes, desde 2007 investiga novos casos de doença de Chagas em pacientes com miocardiopatia dilatada sem etiologia definida. Até 2018, 23 casos foram registrados,

ocorrendo quatro óbitos relacionados à piora do quadro de insuficiência cardíaca (JMBB Ferreira: dados não publicados).

A cardiopatia chagásica pouco tem sido descrita na nossa região, sendo o último estudo com uma abordagem semelhante publicado há 10 anos, que aliadas às dificuldades enfrentadas no diagnóstico da DC em sua forma crônica e à falta de conhecimento entre os próprios profissionais da ocorrência da DC impossibilitam conhecer e compreender a seu perfil epidemiológico e dinâmica na Amazônia Brasileira. Desta forma, tornando necessária a investigação e o acompanhamento desses casos a fim de obter esse conhecimento e principalmente, melhorar o manejo do paciente.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a prevalência da doença de Chagas em pacientes com miocardiopatia dilatada sem etiologia definida autóctones da Amazônia.

2.2. Específicos

- I. Correlacionar a presença de cardiopatia chagásica com variáveis clínico-epidemiológicas;
- II. Descrever as alterações cardíacas;
- III. Identificar a linhagem do *Trypanosoma cruzi*.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

3.1. Manuscrito científico redigido conforme normas da revista escolhida para submissão.



Área de Avaliação: Medicina II – Qualis A1

Fator de Impacto (JCR 2017): 4,034

Categoria: Short Communication

Chagas cardiomyopathy in the Brazilian Amazon region: low prevalence or underdiagnosed?

Jessica Vanina Ortiz^{[1],[2]}, Katia do Nascimento Couceiro^{[1],[2]}, Susan Smith Doria^{[1],[2]}, Débora Raysa Teixeira de Sousa^{[1],[2]}, George Allan Villarouco da Silva^[3], Evelyn Beatriz da Costa Vaz^{[1],[2]}, Auxiliadora Cruz Messa Chiarion^[2], Kenny Rodrigues de Souza^{[1],[2]}, Rubens Celso Andrade da Silva Júnior^{[1],[2]}, Rosa Amélia Gonçalves Santana^{[1],[2]}, Arineia Soares da Silva^{[1],[2]}, Rômulo Freire de Morais^[2], Henrique Manuel Condinho da Silveira^[4], Norival Kesper Junior^[5], Leila Inês Aguiar Raposo Câmara Coelho^[3], Maria das Graças Vale Barbosa Guerra^{[1],[2]}, Jorge Augusto de Oliveira Guerra^{[1],[2]}, João Marcos Bemfica Barbosa Ferreira^{*[1],[2],[6]}.

[1]. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM. [2]. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM. [3]. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM. [4.] Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, Portugal [5]. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, SP. [6]. Hospital Francisca Mendes, Manaus, AM.

Corresponding author: Dr. João Marcos Bemfica Barbosa Ferreira. Hospital Universitário Francisca Mendes, UFAM. Av. Camapuã, Manaus, AM, Brazil.

Email: jmbemfica@hotmail.com

Abstract

Background: Chagas cardiomyopathy implicates in long-term morbidities, representing worldwide health and economic concern. In the Brazilian Amazon region, the epidemiological profile of this condition is not well elucidated, along with a remaining difficulty of diagnosis of chronic Chagas disease.

Objective: To evaluate the prevalence of Chagas disease in patients with dilated cardiomyopathy of unknown etiology in the Brazilian Amazon region.

Methods: We evaluated patients attended at the Francisca Mendes University Hospital. All individuals included in the study were natural from any State belonging to the Brazilian Amazon region with epidemiological risk factors and has no previous history of travelling to any other Brazilian region. Blood sample were subjected to two primary serological methods, ELISA and IIF, and one confirmation method, western blotting using TESA (TESA blot).

Results: We recruited 45 individuals with dilated cardiomyopathy of unknown etiology from July, 2017 to July, 2018. From ELISA, one serum sample was reactive. From IIF, five samples were reactive and eight were indeterminate. In total 14 serum samples were subjected to TESA blot testing and none came up reactive.

Conclusion: Thus, we were not able to confirm diagnosis of Chagas disease in any of the individuals of this study. This result left us with no answer of the real epidemiological profile of Chagas cardiomyopathy in the Amazon region, and for it, the concern of diagnosing this group of patients continues, to which protocols are established to keep the tracking.

Keywords

Chronic Chagas disease. Heart failure. Brazilian Amazon. Chagas Cardiomyopathy

Introduction

Chagas' disease (CD) is a well-known serious worldwide public health concern. It was discovered by a Brazilian physician Carlos Chagas in 1909, who was the first ever to describe all the aspects of a new disease: the etiological agent, a flagellated protozoan named *Trypanosoma cruzi*, its morphological features, life cycle, the transmission path and clinical manifestations⁽¹⁾.

The disease can be transmitted, primarily via feces of triatomine insects, even though, oral transmission through contaminated food has been considered the main transmission path in the Brazilian Amazon region⁽²⁾. CD presents in two clinical phases: the acute infection, mostly symptomatic with high parasitemia, on the other hand, the chronic infection is divided as an asymptomatic indeterminate form or present as either digestive symptoms or cardiac symptoms⁽³⁾.

The symptomatic chronic cardiac manifestation is called Chagas cardiomyopathy (CCM) is characterized as a dilated cardiomyopathy due to the long-term inflammation believed to be caused by non-flagellated, amastigotes forms of the parasite. Therefore, is as well considered not only health problem but also implicates in economic burden. Dilated cardiomyopathy may present as consequence of innumerable conditions, and at times, no definitive cause is known, for it, called idiopathic dilated cardiomyopathy (IDCM)⁽⁴⁾.

Studies have shown that dilated cardiomyopathy due to CD has worse prognostic, with worse quality of life, higher hospitalization and mortality rates. In Latin America, CCM is the main cause of death between patients with non-ischemic cardiomyopathy⁽⁵⁻⁷⁾.

The World Health Organization estimates that 8 million people are infected by *T. cruzi* worldwide, 1.6 million Brazilian residents. Of these, about 1.1 million live with the chronic cardiac manifestations worldwide and in Brazil, about 232 thousand people living with CCM⁽⁸⁾⁽⁴⁾. In the Brazilian Amazon region little has been published about chronic CD and CCM, the first report of chronic cases was made by Ferraroni in 1977⁽⁹⁾, and the first cases of CCM was reported in 2003, by Albajar *et al.*⁽¹⁰⁾, followed by Xavier, 2006⁽¹¹⁾ and Ferreira in 2009⁽¹²⁾.

Since then, no data has been published in order to establish a consensus about the epidemiological features of chronic CD and CCM in the Brazilian Amazon region. But, in an outpatient, ten-year follow-up (2007-2018) at the Francisca Mendes University Hospital and Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado in Manaus (Amazonas, Brazil), 23 patients with IDCM has been diagnosed with CD.

The diagnosis for chronic CD is essentially serological, in which is considered two different serological methods reactive in order to confirm the disease. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence (IIF) and western blotting are used as official methods. Parasitological and molecular biology are used as complementary methods. Molecular biology techniques have been widely used to genotype the strain of the *T. cruzi* that is circulating in the area, and has questionable results for confirming diagnosis⁽³⁾⁽¹³⁾.

The aim of the study was to evaluate the prevalence of Chagas disease in patients with idiopathic Chagas cardiomyopathy in the Brazilian Amazon region in order to try to answer two main questions: is Chagas cardiomyopathy being underdiagnosed? Or in fact, there is a low prevalence of this disease in our region?

Methods

Study Sites

This was a cross-sectional study conducted at the Francisca Mendes University Hospital and Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado, both specialized tertiary-care facilities in cardiology and infectious diseases, respectively in the State of Amazonas. between July, 2017 and July 2018.

Study Population

Participants were recruited from July, 2017 to July, 2018 and were eligible for inclusion if attended the following criteria: aged ≥ 18 years, had a cardiac profile of idiopathic dilated cardiomyopathy with alterations in a transthoracic echocardiogram and electrocardiogram such

as reduced left-ventricular ejection fraction (LVEF) (<52% for men and <54% for women), segmental alterations, bundle branch blocks, atrial ventricular blocks or arrhythmias.

It was also considered epidemiological risk factors such as being originally from any of the states that include the Brazilian Amazon region (Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, part of Maranhão, Rondônia, Roraima and Tocantins), specially from rural areas, habits of going into the jungle, types of homes, consumption of palmeira's fruits and/or meat of wild mammals.

Patients that presented any evidence of any other etiology for the cardiopathy such as ischemic, hypertensive or congenital cardiomyopathy or valve disease were not eligible for inclusion. As well as all participants that referred any previous travel to another Brazilian region or foreign country or did not come to collect the biological samples were excluded from this study.

Procedures for data and sample collection

The identification of eligible patients occurred during clinical attendance at the Francisca Mendes cardiomyopathy service, all patients were invited to participate in the study and standardized informed consent were signed by each one of them. After the informed consent, they were evaluated through a Clinical and Epidemiological Questionnaire standardized for this research. Blood sample was collected, centrifuged, separated and stocked at -20°C in the Entomology Center at Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado.

Procedures for sample testing by serological methods

Serological tests were performed in all serum samples using Enzyme-linked Immunosorbent Assay-ELISA (Chagatest ELISA recombinante v. 4.0, Wiener Laboratorios, Argentina) and Indirect Immunofluoresce-IIF (Imuno-CON Chagas, WAMA Diagnostica, Brasil). For indeterminate serum, Western Blot (TESA-blot test) was performed as a confirmation method. For confirmed diagnosis, two reactive serological methods were considered.

For conventional ELISA and IIF, commercial kits were used and all protocols were followed as defined by the provider. For the Western Blot test, and *in-house* Trypomastigote Excreted-Secreted Antigen - TESA-blot was used, which consisted of fractions obtained from supernatant of MK2 cells infected with *T. cruzi* Y strains isolated at the Protozoology Laboratory of the

Tropical Medicine Institute, São Paulo, following the protocol as previously described by Umezawa *et al*⁽¹⁴⁾.

Ethical Consideration

This study is part of a research funding program by FAPEAM/AM n°30/2013. It was approved by the Research Ethics Committee of Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado (Manaus, AM, Brazil) under the approval number 69904017.9.0000.0005-2.191.571/28, July of 2017, in agreement with the Resolution 466/12 of the Brazilian National Health Council and ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

Data Presentation and Analysis

Categorical variables frequencies and proportions (%) are reported, whereas continuous variables are described with means and standard deviations. No statistical analyses were applied.

Results

Prevalence of Chagas disease

During the study period, a number of 256 patients were attended at the cardiomyopathy service of the Francisca Mendes University Hospital. Of these, 53 patients had an ongoing investigation for the diagnosis of their dilated cardiomyopathy. They were included, all originally from the Brazilian Amazon and eight were excluded from the analysis, one died before going to collect peripheral blood sample, two of them mentioned to have lived elsewhere, and five did not show up for the biological sample collection (Fig. 1).

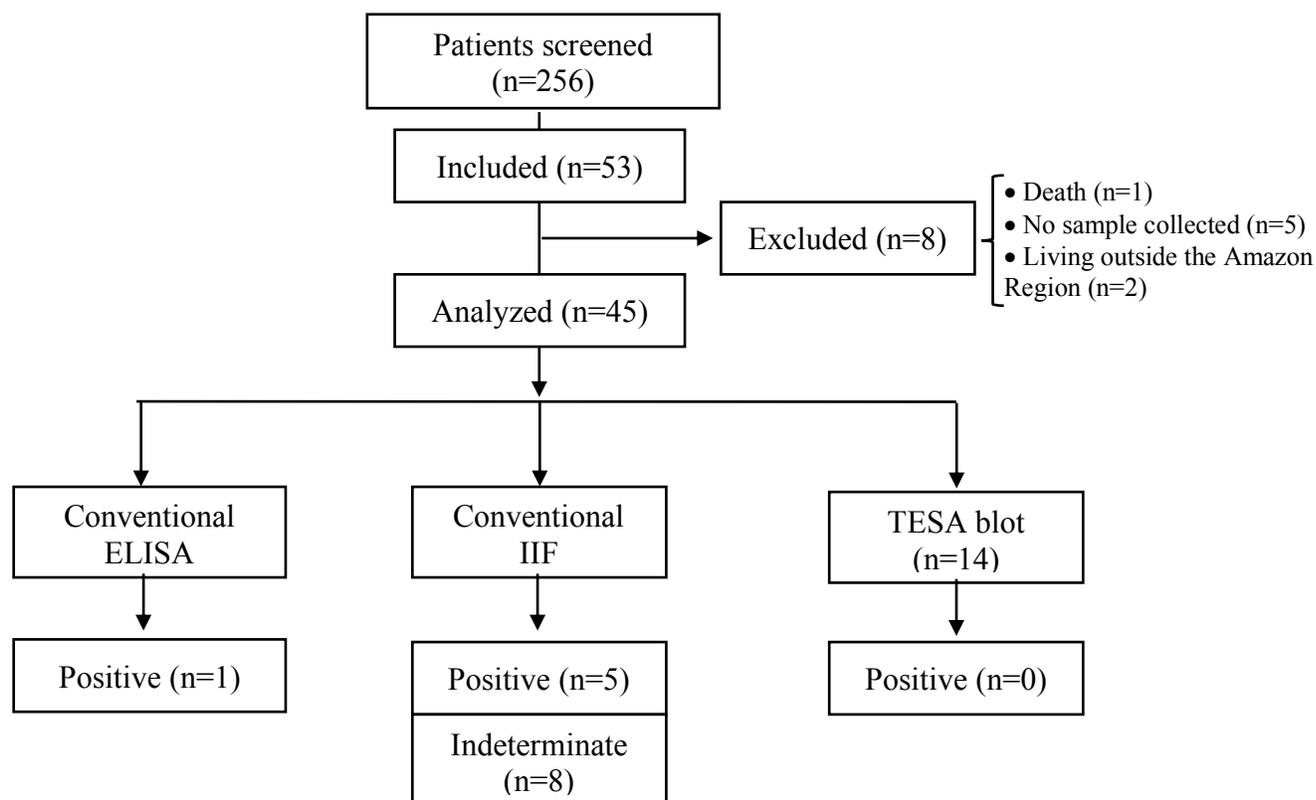


Figure 1 – Flow diagram of patient screening and eligibility attended at the Francisca Mendes Hospital outpatient dilated cardiomyopathy service between July, 2017 and July, 2018.

In 45 suitable samples, two serological methods tests were performed, following the order: (1) ELISA, (2) and IIF. TESA-blot was performed in indeterminate serum samples. One came up positive in ELISA, five positives and eight inconclusive results in IIF, however, the one sample reagent in ELISA did not react in IIF. Considering the indeterminate results of 14 (31%) samples, they were all submitted to tesablot confirmatory test at the Tropical Medicine Institute in São Paulo. All samples came up with negative results, thus, none of the suspected cases of Chagas cardiomyopathy were confirmed.

The mean age of the 45 patients was $59,3 \pm 12,3$ years old, mostly male (77,8%), who have lived in rural areas (75,6%) and worked with agriculture and fishing activities (60%). All patients had reduced left ventricular ejection fraction, since it was the primary inclusion criteria, with a mean of $30,3 \pm 10,7$ % and a mean left ventricular diastolic diameter of $64,6 \pm 9,1$ mm. Among some

of the electrocardiographic alterations, the most frequent was left ventricular repolarization alteration (47%) (Table 1).

Table 1 – Demographic and clinical characteristics of all suspected cases of Chagas cardiomyopathy.

Variable	Total (n=45)
Age (y)	59,3 ± 12,3
Gender	
Male	35 (77,8%)
Female	10 (22,2%)
Area	
Rural	34 (75,6%)
Urban	11 (24,4%)
Origin	
Acre	4 (9,0%)
Amazonas	32 (71,1%)
Maranhão	1 (2,2%)
Pará	6 (13,3%)
Roraima	2 (4,4%)
Susceptibility factors*	
Agriculture/extrativism/fishing	27 (60,0%)
Game meat consumption	32 (71,1%)
Açaí fruits consumption	30 (66,7%)
Habit to enter the woods	30 (66,7%)
Electrocardiogram*	
Right bundle branch block	2 (4,4%)
Left bundle branch block	4 (8,9%)
Left anterior fascicular block	2 (4,4%)
Atrial fibrillation	3 (6,7%)
Ventricular repolarization alteration	21 (47,0%)
Transthoracic echocardiogram*	
Left ventricular ejection fraction (%)	30,3 ± 10,7
Left ventricular diastolic diameter (mm)	64,6 ± 9,1
Akinesia	7 (15,6%)
Diffuse hypokinesia	11 (24,4%)

Comorbidities*

Diabetes mellitus

9 (20,0%)

Hypertension

22 (49,0%)

*Data are expressed as mean \pm SD. In parenthesis are the percentage of the total group. LVEF = left ventricular ejection fraction; *Some individuals did have complete data.*

Discussion

Prevalence of Chagas disease

Out of the 45 included individuals, 14 had at least one serological method positive. Previous studies in the Brazilian Amazon region⁽¹⁵⁾, have reported a low prevalence and low morbidity of Chagas disease in our region. Others, have discussed the probable low sensibility of available commercial serological tests used for the diagnosis^(16,17).

For a long time, it was believed that Chagas disease did not exist in the Brazilian Amazon, this profile has changed and a numerous cases of acute Chagas disease and chronic Chagas disease have been reported and shown that the disease is a very important public health concern as it is in other regions of Brazil and it is, now, in the world.

On the other hand, what it's known about Chagas cardiomyopathy is very clear in southern, northeast and western Brazilian region⁽¹⁸⁾. This knowledge has not reached the Amazon region yet, only three studies in our region has officially reported Chagas cardiomyopathy cases^(10,11) and one of them, by Ferreira *et al.*⁽¹²⁾ done a very similar study that included patients with left ventricular systolic dysfunction with unknown etiology. They found an 8,1% prevalence. This study tried to find more cases, but it faced with the difficulty of diagnosis, aside from the fact that no many health professionals investigate Chagas disease as a probable cause of dilated cardiomyopathy.

Chagas cardiomyopathy's prognosis is very well established: increased risk of death, increased risk of hospitalization and greater care in patient management. Cardiac alterations related to this cause had reported more frequent right bundle branch block, left fascicular block, or the association of both and apical akinesia^(19,20).

In this study, it was not possible to confirm any new case of Chagas disease in patients with unknown cause of their dilated cardiomyopathy. All of the common causes were excluded at the time of inclusion in the study such as hypertensive cardiomyopathy, valve disease or coronary disease. Therefore, these patients remain with an undefined heart disease.

Even though the results of this study did not identify new cases as the initial proposal was, these results raise some questions: Is chronic Chagas disease still underdiagnosed in the Brazilian Amazon region? Is Chagas cardiomyopathy's diagnosis consequence of this problem? Are the serological methods available not corresponding well enough to detect the strain of the parasite circulating in this region?

Conclusions

We found a low prevalence of Chagas cardiomyopathy in the Brazilian Amazon region. Most human sera in this location have low reactivity of serological methods and moderate cross-reactivity with any other microorganism, this scenario makes it difficult to diagnose Chagas disease. For instance, is very important to continue epidemiological and clinical search established in protocol in order to enlighten the real situation of Chagas cardiomyopathy in the Amazon region.

Acknowledgments

We would like to thank the Protozoology Lab of the São Paulo Tropical Medicine Institute for helping with the immunoblotting techniques.

Conflict of interest

The authors declare that there are no relevant conflicts of interest.

Financial support

This study was funded by FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas under the Universal Amazonas notice nº 30/2013.

References

1. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909;1(2):159–218.
2. Santana RAG, Guerra M das GVB, Sousa DR, Couceiro K do N, Ortiz JV, Oliveira M, et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(1):132–5.
3. Dias JCP, Ramos Jr. AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2016;25(núm.esp.):7–86.
4. Andrade J, Marin-Neto J, Paola A, Vilas-Boas F, Oliveira G, Bacal F, et al. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(2 Supl.3):01-48.
5. Vieira JL, Rocha F, Távora F, Gyslane M, Sobral V, Vasconcelos GG, et al. Chagas Cardiomyopathy in Latin America Review. *Current Cardiology Reports*; 2019;
6. Jr AR, Rassi SG, Rassi A, Brazil GO. Sudden Death in Chagas ' Disease. 2001;76(1):86–96.
7. Bestetti RB, Muccillo G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 1997;60(2):187–93.
8. World Health Organization. Fourth WHO Report on neglected Tropical Diseases: Integrating neglected tropical diseases into global health and development. IV WHO Rep Neglected Trop Dis. 2017;4:1–271.
9. Ferraroni J, Melo JN de, Camargo M. Moléstia de Chagas na Amazônia. Ocorrência de seis casos suspeitos, autóctones, sorologicamente positivos. *Acta Amaz*. 1977;7(3):438–40.
10. Viñas Albajar P, Velihovetchi Laredo S, Brasil Terrazas M, Rodrigues Coura J. Miocardiopatia dilatada em pacientes com infecção chagásica crônica. Relato de dois casos fatais autóctones do Rio Negro, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(3):401–7.
11. Xavier SS, Sousa AS, Viñas PA, Junqueira AC V, Bóia MN, Coura JR. Cardiopatia chagásica crônica no Rio Negro, Estado do Amazonas. Relato de três novos casos autóctones, comprovados por exames sorológicos, clínicos, radiográficos do tórax, eletro e ecocardiográficos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(2):211–6.
12. Barbosa JMBB, Augusto J, Guerra DO, Maria B, Magalhães L, et al. Chronic chagasic cardiopathy in Amazon region: an etiology to remember. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(6):e93-5, e107-9.

13. CONITEC, Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. 2018;1–144.
14. Junqueira AC, Camargo ME, Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N, Medicina I De, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital , acute , and chronic Chagas ' disease . Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital , Acute ,. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2143–7.
15. Coura JR, Junqueira AC, Ferreira JMB. Surveillance of seroepidemiology and morbidity of Chagas disease in the Negro River, Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(1):17–23.
16. Barbosa MG, Barbosa-Ferreira JMB, Arcanjo ARL, Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LLC, et al. Chagas disease in the State of Amazonas: History, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(Suppl. 1):27–33.
17. Magalhães BML, Coelho LIARC, Maciel MG, Ferreira JMBB, Umezawa ES, Coura JR, et al. Serological survey for Chagas disease in the rural areas of Manaus, Coari, and Tefé in the Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(6):697–702.
18. Rassi Jr. A, Rassi A, Little W, Xavier S, Rassi S, Rassi A, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med.* 2006;355(23):799–808.
19. Kapelusz L, Varela D, Montgomery SP, Shah AN, Steurer FJ, Rubinstein D, et al. Chagas Disease in Latin American Immigrants With Dilated Cardiomyopathy in New York City. *Clin Infect Dis.* 2013;57(1):e7–e7.
20. Traina MI, Sanchez DR, Hernandez S, Bradfield JS, Labedi MR, Ngab TA, et al. Prevalence and Impact of Chagas Disease among Latin American Immigrants with Nonischemic Cardiomyopathy in Los Angeles, California. *Circ Hear Fail.* 2015;8(5):938–43.

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Este estudo foi descritivo, com corte transversal realizado em um período de 12 meses, com um tamanho amostral relativamente pequeno. Esses fatores não permitiram obter informações concretas sobre o real cenário da cardiopatia chagásica na região da Amazônia Brasileira. Sendo assim, o rastreamento dar-se-á de forma contínua com o intuito de ampliar a amostragem e os locais de recrutamento deste grupo de pacientes, assim como, continuar a divulgação da importância que existe em suspeitar da doença de Chagas quando as outras etiologias já foram descartadas.

5. CONCLUSÃO

1. Foi possível observar uma baixa prevalência da cardiopatia chagásica na região Amazônica;
2. Das 45 amostras, 14 (31%) mostraram-se reativas em um os métodos aplicados, e destas, duas tiveram o DNA amplificado;
3. Os resultados sorológicos demonstram a dificuldade diagnóstica e o provável alto índice de reações cruzadas com outras doenças como malária e leishmaniose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lewinsohn R. Carlos Chagas and the discovery of Chagas' disease (American trypanosomiasis). *J R Soc Med*. 1981;74(6):451–5.
2. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909;1(2):159–218.
3. Mitra AK, Mawson AR. Neglected Tropical Diseases: Epidemiology and Global Burden. *Trop Med Infect Dis*. 2017;2(3):36.
4. CONITEC, Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. 2018;1–144.
5. World Health Organization. Fourth WHO Report on neglected Tropical Diseases: Integrating neglected tropical diseases into global health and development. *IV WHO Rep Neglected Trop Dis*. 2017;4:1–271.
6. Silva NN, Clausell DT, Nólíbos H, de Mello AL, Ossanai J, Rapone T, et al. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. Vol. 10, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1968. p. 265–76.
7. Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, et al. Update on oral chagas disease outbreaks in Venezuela: Epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):377–86.
8. Barbosa MG, Barbosa-Ferreira JMB, Arcanjo ARL, Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LLC, et al. Chagas disease in the State of Amazonas: History, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(Suppl. 1):27–33.
9. Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasit Vectors*. 2014;7(1):317.
10. Meymandi SK, Forsyth CJ, Soverow J, Hernandez S, Hernandez DS, Montgomery SP, et al. Prevalence of chagas disease in the Latin American-born population of Los Angeles. *Clin Infect Dis*. 2017;64(9):1182–8.
11. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2017;6736(17):1–13.
12. Abras A, Gállego M, Muñoz C, Juiz NA, Ramírez JC, Cura CI, et al. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain). *Parasitol Int*. Elsevier Ireland Ltd; 2017;66(2):83–8.
13. Martínez-Pérez A, Poveda C, Ramírez JD, Norman F, Gironés N, Guhl F, et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*'s Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain. *Acta Trop*. Elsevier B.V.; 2016;157:145–50.
14. Andrade J, Marin-Neto J, Paola A, Vilas-Boas F, Oliveira G, Bacal F, et al. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(2 Supl.3):01-48.
15. Stahl P, Meyer T. Novel insights into the pathophysiology of Chagas' Cardiomyopathy. *INTECH World's Larg Sci Technol Med*. 2013;Chapter 11:215–33.
16. Petruccelli KC, Tavares GC, Lima MP, Ortiz JV, Brandão AR, Couceiro KDN, et al. Type 1 cardiorenal syndrome in a patient with an acute infection caused by *Trypanosoma cruzi* in the Brazilian Amazon region – A case report. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018;51(6):869–72.

17. Marino VP, Dumont SM, Mota L das G, Braga D, Freitas SS de, Moreira M da C. Sympathetic autonomic denervation in heart failure: Comparison of Chagas' heart disease with other dilated cardiomyopathy. *Eur Int J Sci Technol.* 2017;6(6):49–60.
18. Barbosa MPT, Carmo AAL do, Rocha MO da C, Ribeiro ALP. Ventricular arrhythmias in Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(1):4–10.
19. Souza DDSM, Povia RMDs, Schmidt A, Pazin-Filho A, Marin-Nto JA, Maciel BC, et al. Atualização em Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos e clínicos da doença de Chagas aguda no Brasil e na América Latina. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo.* 2016;26(4):222–9.
20. Neeki MM, Park M, Sandhu K, Seiler K, Toy J, Rabiei M, et al. Chagas disease-induced sudden cardiac arrest. *Clin Pract Cases Emerg Med.* 2017;1–5.
21. Rassi Jr. A, Rassi G, Rassi A. Morte súbita na doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol.* 2001;76(nº 1):75–85.
22. World Health Organization. Anti-Trypanosoma cruzi Assays: Operational Characteristics. Report 1. *Diagnostics Lab Technol.* 2010;1–43.
23. Voller A. Microplate enzyme-linked Immunosorbent assay for Chagas' disease. *Lancet.* 1975;426–8.
24. Junqueira AC, Camargo ME, Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N, Medicina I De, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of Trypanosoma cruzi in serodiagnosis of congenital , acute , and chronic Chagas ' disease . Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of Trypanosoma cruzi in Serodiagnosis of Congenital , Acute ,. *J Clin Microbiol [Internet].* 1996;34(9):2143–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229206/pdf/342143.pdf>
25. Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W. Evaluation of the xenodiagnosis of chronic Chagas patients infected ten years or over in an area where transmission has been interrupted--Iguatama and Pains, west Minas Gerais State, Brazil. Vol. 86, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1991. p. 395–8.
26. Chiari E, Dias JC, Lana M, Chiari C a. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989;22(1):19–23.
27. Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: Do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saude Publica.* 2003;37(1):107–15.
28. Sales Jr. PA, Molina I, Murta SMF, Sanchez-Montalva A, Salvador F, Oliveira RC de, et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A Review. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;1–33.
29. Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saude Publica São Paulo.* 1969;3(2):153–7.
30. França MS, Frade JM, Konasugawa K, Almeida FB De. Doença de Chagas - primeiro caso autóctone na Amazônia Ocidental - Amazonas - Brasil. *Acta Amaz.* 1980;10(4):759–62.
31. Ferraroni J, Melo JN de, Camargo M. Moléstia de Chagas na Amazônia. Ocorrência de seis casos suspeitos, autóctones, sorologicamente positivos. *Acta Amaz.* 1977;7(3):438–40.

32. Brum-Soares LM, Xavier SS, Sousa AS De, Borges-Pereira J, Ferreira JM BB, Costa IR, et al. Morbidade da doença de Chagas em pacientes autóctones da microrregião do Rio Negro, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):170–7.
33. Coura JR, Albajar Viñas P, Brum-Soares LM, de Sousa AS, Xavier SS. Morbidity of Chagas heart disease in the microregion of Rio Negro, Amazonian Brazil: A case-control study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(8):1009–13.
34. Duncan WP, Danilow JL, Malheiro A. Piassaba palm extractivism as an associated factor with Chagas disease: seroprevalence and immunological profile in native inhabitants of the Central Amazonia, Brazil. *Rev Pan-Amazônica Saúde.* 2015;6(3):35–42.
35. Costa E, Oliveira S, Sojo-Milano M, Amador ECC, Tatto E, Souza DSM, et al. Acute Chagas disease in Brazilian Amazon: Epidemiological and clinical features. *Int J Cardiol. Elsevier Ireland Ltd;* 2017;
36. Valente SA da S, Valente V da C, Neto HF. Considerations on the Epidemiology and Transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94(Suppl. 1):395–8.
37. Monteiro WM, Vale G, Jean M, Toledo DO, Fé FA, Fé F. Série de casos agudos de doença de Chagas atendidos num serviço terciário de Manaus , Estado do Amazonas , de 1980 a 2006 Series of acute Chagas ' disease cases a tt ended at a tertiary-level clinic in Manaus , State of. 2010;43(2):207–10.
38. Barbosa M das GV, Ferreira JM BB, Arcanjo ARL, Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, et al. Chagas disease in the state of amazonas: History, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(September 2014):27–33.
39. Santana RAG, Guerra M das GVB, Sousa DR, Couceiro K do N, Ortiz JV, Oliveira M, et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(1):132–5.
40. Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR. Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102 Suppl(2002):47–56.
41. Coura JR, Junqueira AC, Ferreira JMB. Surveillance of seroepidemiology and morbidity of Chagas disease in the Negro River, Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(1):17–23.
42. Magalhães BML, Coelho LIARC, Maciel MG, Ferreira JM BB, Umezawa ES, Coura JR, et al. Serological survey for Chagas disease in the rural areas of Manaus, Coari, and Tefé in the Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(6):697–702.
43. Moncayo Á, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology , surveillance and health policy. 2009;104(May):17–30.
44. Medeiros MB De, Guerra JA de O, Lacerda MVG de. Meningoencephalitis in a patient with acute Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(5):520–1.
45. Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT. Geographic distribution of chagas disease vectors in brazil based on ecological niche modeling. *J Trop Med.* 2012;1–15.

46. Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas Jr VD, et al. Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas). Inst Oswaldo Cruz. 2014;1–58.
47. Fé NF, Magalhães LK, Fé FA, Arakian SK, Monteiro WM, Barbosa MDGV. Occurrences of triatomines in wild and domestic environments in the municipality of Manaus, State of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(6):642–6.
48. Manoel-Caetano FDS, Silva AE. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad Saude Publica.* 2007;23(10):2263–74.
49. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an inventory. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(8):1–19.
50. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(7):1051–4.
51. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol.* 1998;28(1):85–104.
52. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 2017;184: 38-52.
53. Monteiro WM, Margioto Teston AP, Gruending AP, dos Reis D, Gomes ML, Marques de Araújo S, et al. *Trypanosoma cruzi* I and IV Stocks from Brazilian Amazon Are Divergent in Terms of Biological and Medical Properties in Mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(2):1–9.
54. Monteiro WM, Magalhães LKC, de Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJ de O, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One.* 2012;7(7):1–9.
55. Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* Informa UK, Ltd.; 2015;13(8):995–1029.
56. Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas cardiomyopathy manifestations and *trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(11):1–9.
57. Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LLC, Prestes SR, Maciel MG, Silva GAV, et al. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors.* 2014;7(267):1–7.
58. Nunes M do CP, Rocha MOC. Fatores determinantes da morbimortalidade na cardiopatia chagásica crônica. *Rev Médica Minas Gerais.* 2009;19(4):336–42.
59. Nunes M do CP, Barbosa MM, Ribeiro ALP, Fenelon LMA, Rocha MOC. Predictors of Mortality in Patients With Dilated Cardiomyopathy: Relevance of Chagas Disease as an Etiological Factor. *Rev Española Cardiol (English Ed. Elsevier);* 2010;63(7):788–97.
60. Rassi Jr. A, Rassi A, Little W, Xavier S, Rassi S, Rassi A, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med.* 2006;355(23):799–808.

61. Bestetti RB, Muccillo G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 1997;60(2):187–93.
62. Issa VS, Amaral AF, Cruz FD, Ferreira SMA, Guimaraes G V., Chizzola PR, et al. Blocker Therapy and Mortality of Patients With Chagas Cardiomyopathy: A Subanalysis of the REMADHE Prospective Trial. *Circ Hear Fail.* 2010;3(1):82–8.
63. Shen L, Ramires F, Martinez F, Bodanese LC, Echeverría LE, Gómez EA, et al. Contemporary Characteristics and Outcomes in Chagasic Heart Failure Compared With Other Nonischemic and Ischemic Cardiomyopathy. *Circ Hear Fail* [Internet]. 2017;10(11):e004361. Available from: <http://circheartfailure.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004361>
64. Terhoch B, Moreira HF, Ayub-ferreira SM, Maria V, Salemi C, Chizzola PR, et al. Clinical findings and prognosis of patients hospitalized for acute decompensated heart failure : Analysis of the influence of Chagas etiology and ventricular function. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(2):1–16.
65. Kapelusznik L, Varela D, Montgomery SP, Shah AN, Steurer FJ, Rubinstein D, et al. Chagas Disease in Latin American Immigrants With Dilated Cardiomyopathy in New York City. *Clin Infect Dis.* 2013;57(1):e7–e7.
66. Traina MI, Sanchez DR, Hernandez S, Bradfield JS, Labedi MR, Ngab TA, et al. Prevalence and Impact of Chagas Disease among Latin American Immigrants with Nonischemic Cardiomyopathy in Los Angeles, California. *Circ Hear Fail.* 2015;8(5):938–43.
67. Nielebock MAP, Regazio FM, Mendes M, Rocha R, Figueredo L, Sangenis LHC. Soroprevalência da doença de Chagas em cardiopatas internados em um hospital de referência da região Serrana do estado do Rio de Janeiro , Brasil. *Cad UniFOA.* 2017;(33):131–8.
68. Bocchi EA, Marcondes-Braga F, Ayub-Ferreira S, Rohde L, Oliveira W, Almeida D. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(1 Suppl. 1):1–70.
69. Albuquerque DC de, Souza Neto JD de, Bacal F, Rohde LEP, Bernardes-Pereira S, Berwanger O, et al. I Registro Brasileiro de Insuficiência Cardíaca - Aspectos Clínicos, Qualidade Assistencial e Desfechos Hospitalares. *Arq Bras Cardiol.* 2015;104(6):433–42.
70. Marin-neto JA, Simões MV, Sarabanda ÁVL. Cardiopatia Chagásica. 1999;72(nº 3):247–63.
71. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões M V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;115(9):1109–23.
72. Cançado JR, Chuster M. Cardiopatia Chagásica. 1st ed. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas; 1985. 425 p.
73. Higuchi M de L, Benvenuti LA, Reis MM, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 2003;60(1):96–107.
74. Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas Cardiomyopathy-Where Do We Stand After a Hundred Years? *Prog Cardiovasc Dis.* Elsevier Inc.; 2010;52(4):300–16.
75. Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas Cardiomyopathy-Where Do We Stand After a Hundred Years? *Prog Cardiovasc Dis* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;52(4):300–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcad.2009.11.008>

76. Barbosa-Ferreira JM, Mady C, Ianni BM, Lopes HF, Ramires FJA, Salemi VMC, et al. Dysregulation of autonomic nervous system in chagas' heart disease is associated with altered adipocytokines levels. *PLoS One*. 2015;10(7):1–14.
77. Barbosa AP, Cardinali-Neto A, Otaviano AP, Rocha BF da, Bestetti RB. Comparação do desfecho entre a cardiopatia chagásica e a miocardiopatia dilatada idiopática. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(6):517–25.
78. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295–306.
79. Viñas Albajar P, Velihovetchi Laredo S, Brasil Terrazas M, Rodrigues Coura J. Miocardiopatia dilatada em pacientes com infecção chagásica crônica. Relato de dois casos fatais autóctones do Rio Negro, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(3):401–7.
80. Xavier SS, Sousa AS, Viñas PA, Junqueira AC V, Bóia MN, Coura JR. Cardiopatia chagásica crônica no Rio Negro, Estado do Amazonas. Relato de três novos casos autóctones, comprovados por exames sorológicos, clínicos, radiográficos do tórax, eletro e ecocardiográficos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(2):211–6.
81. Barbosa-Ferreira JMB, Guerra JA de O, Magalhães BML, Coelho LI de ARC, Maciel MG, Guerra M das GVB. Cardiopatia chagásica crônica na Amazônia: Uma etiologia a ser lembrada. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(6):107–9.
82. Ferreira JM, Guerra JA de O, Barbosa M das GV. Ventricular aneurysm in a chronic Chagas disease patient from the Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(4):474–5.
83. Barbosa-Ferreira JM, Nobre AF, Maldonado JGA, Borges-Pereira J, Zauza PL, Coura JR. Acidente vascular encefálico isquêmico em paciente chagásico crônico autóctone da Amazônia Brasileira. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(6):751–3.

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1

Procedimentos Operacionais Padrão

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP TÍTULO: COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA E CRÔNICA.		
Elaborado por: Jessica V. Ortiz	Revisado e aprovado por: Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra	Data de aplicação 25 de abril de 2019 Data da próxima revisão 25 de abril de 2020

1. OBJETIVO

Estabelecer procedimentos para a coleta e armazenamento de amostras de sangue periférico de pacientes encaminhados do Ambulatório de Doença de Chagas com diagnóstico de doença de Chagas aguda ou crônica.

2. DEFINIÇÕES

Coleta de sangue: técnica utilizada para a obtenção de amostra de sangue periférico com o qual é possível realizar inúmeros tipos de exames para diagnóstico e monitoramento de doenças.

Amostra com camada leucocitária (*buffy coat*): componente sanguíneo obtido após centrifugação de sangue total (tudo com EDTA), é constituída por uma fração de leucócitos e plaquetas.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

Projetos de pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA E CRÔNICA.	Revisão	Página
	01	2

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável técnico, alunos de doutorado, de mestrado e de iniciação científica.

5. POP'S RELACIONADOS

POP_ENT_GPDC_001: Biossegurança e Gerenciamento Ambiental.

POP_ENT_GPDC_003: Critérios laboratoriais para a doença de Chagas aguda.

POP_ENT_GPDC_005: Critérios laboratoriais para a doença de Chagas crônica.

POP_ENT_GPDC_009: Realização de hemocultura para *Trypanosoma cruzi*.

POP_ENT_GPDC_013: Realização do Ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando antígenos de *Trypanosoma cruzi* circulantes na Amazônia Brasileira.

POP_ENT_GPDC_014: Extração de DNA por kit utilizando PureLink Kit® (Invitrogen).

POP_ENT_GPDC_018: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* - Protocolo COII (Gene que codifica a subunidade II da citocromo oxidase).

POP_ENT_GPDC_019: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* - Protocolo GPI (Gene da glicose-fosfato isomerase).

POP_ENT_GPDC_020: Protocolo de purificação para o sequenciamento: Precipitação de produto da PCR com Polienoglicol (PEG).

POP_ENT_GPDC_021: Protocolo de reação de sequenciamento para analisador automático ABI 310 (sequenciador).

6. EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA E CRÔNICA.	Revisão	Página
	01	3

Jaleco

Luvas

7. RECURSOS NECESSÁRIOS

7.1 Materiais

7.1.1. Tubos de coleta (5mL): tampa amarela ou vermelha, e tampa roxa.

7.1.2. Microtubos 1,5mL.

7.1.3. Ponteiras descartáveis em suporte apropriado (200 μ L e 1000 μ L).

7.1.4. Pipetas de 200 μ L e 1000 μ L.

7.1.5. Caixa de descarte de material contaminado com solução desinfetante.

7.2 Equipamentos

7.2.1. Centrífuga.

7.2.2. Freezer -20°C.

8. PROCEDIMENTOS

8.1 Recebimento da amostra

8.1.1. A amostra encaminhada para o Centro de Entomologia será entregue aos responsáveis, que deverão realizar a identificação e o registro da referida amostra;

8.1.2. No registro deverão constar as seguintes informações: iniciais do paciente, data da coleta, se a doença de Chagas é aguda (DCA) ou crônica (DCC), motivo da coleta (sorologia ou PCR).

8.2 Coleta

8.2.1. Se o paciente for encaminhado para o Centro de Entomologia, realizar a coleta em dois tubos: 1 tubo de soro (amarelo ou vermelho) e 1 tubo de EDTA (roxo).

8.2.2. Seguir os mesmos procedimentos do item 8.1.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA E CRÔNICA.	Revisão	Página
	01	4

8.3 Separação do soro

8.3.1. Centrifugar a amostra (tubo amarelo ou vermelho) a 4000rpm por 15 minutos;

8.3.2. Separar o soro (sobrenadante) em um microtubo (Eppendorf), um volume aproximado de 1,5mL. (Caso a amostra tiver maior volume, separar em outro microtubo.

8.3.3. Armazenar no Freezer 1, Gaveta 1, na caixa disponibilizada para a mesma.

8.4 Separação do plasma

8.4.1. Centrifugar a amostra (tubo roxo) a 4000rpm por 15 minutos;

8.4.2. Separar o soro (sobrenadante) em um microtubo (Eppendorf), um volume aproximado de 1,5mL. (Caso a amostra tiver maior volume, separar em outro microtubo.

8.4.3. Armazenar no Freezer 1, Gaveta 1, na caixa disponibilizada para a mesma.

8.5 Separação da camada leucocitária (*buffy-coat*)

8.5.1. Após concluir as etapas do item 8.4.;

8.5.2. Separar um volume mínimo de 200µL da camada leucocitária "*buffy coat*" (Tomar cuidado na hora de pipetar para não provocar uma mistura excessiva com as hemácias concentradas).

8.5.3. Armazenar no Freezer 1, Gaveta 1, na caixa disponibilizada para a mesma.

9. LIMITAÇÕES

Pouco volume de amostra da camada leucocitária por tubo de 4mL.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA E CRÔNICA.	Revisão	Página
	01	5

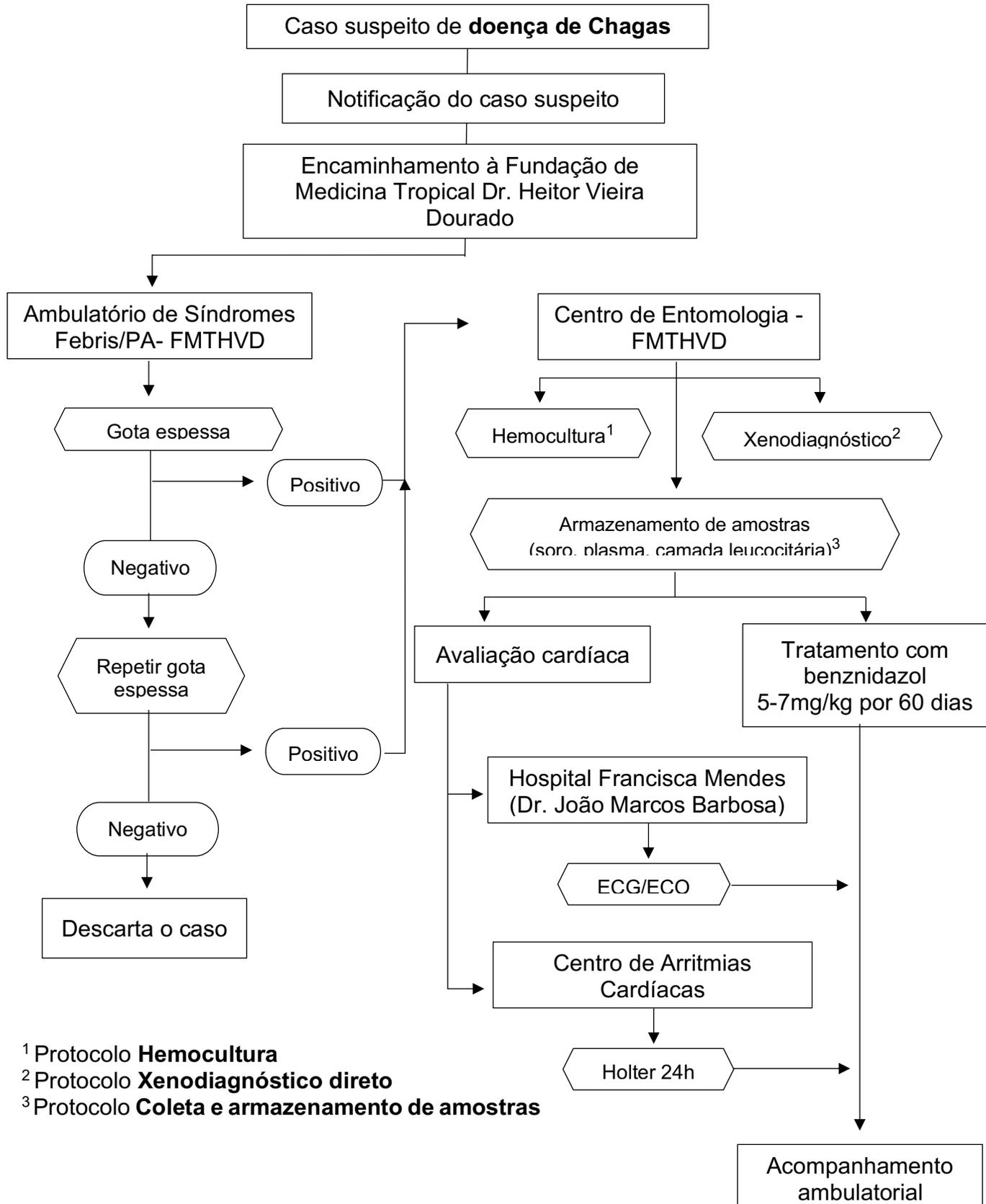
10. REFERÊNCIAS

1. Dias JCP, Ramos Jr. AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol e Serviços Saúde. 2016;25(núm.esp.):7–86.
2. Pedrosa, W. et al. Manual de Exames. Edição 2013-2014. Belo Horizonte: Hermes Pardini, 2013.
3. Câmara, B. Análises Clínicas: Diferença entre soro e plasma. Biomedicina Padrão. 2016. Disponível em: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2016/09/diferenca-entre-plasma-e-soro.html>.

11. ANEXOS

- 11.1 Fluxograma para a doença de Chagas aguda.
- 11.2 Fluxograma para a doença de Chagas crônica.
- 11.3 Identificação e separação do soro, plasma e camada leucocitária nas amostras.

ANEXO I



COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA E CRÔNICA.

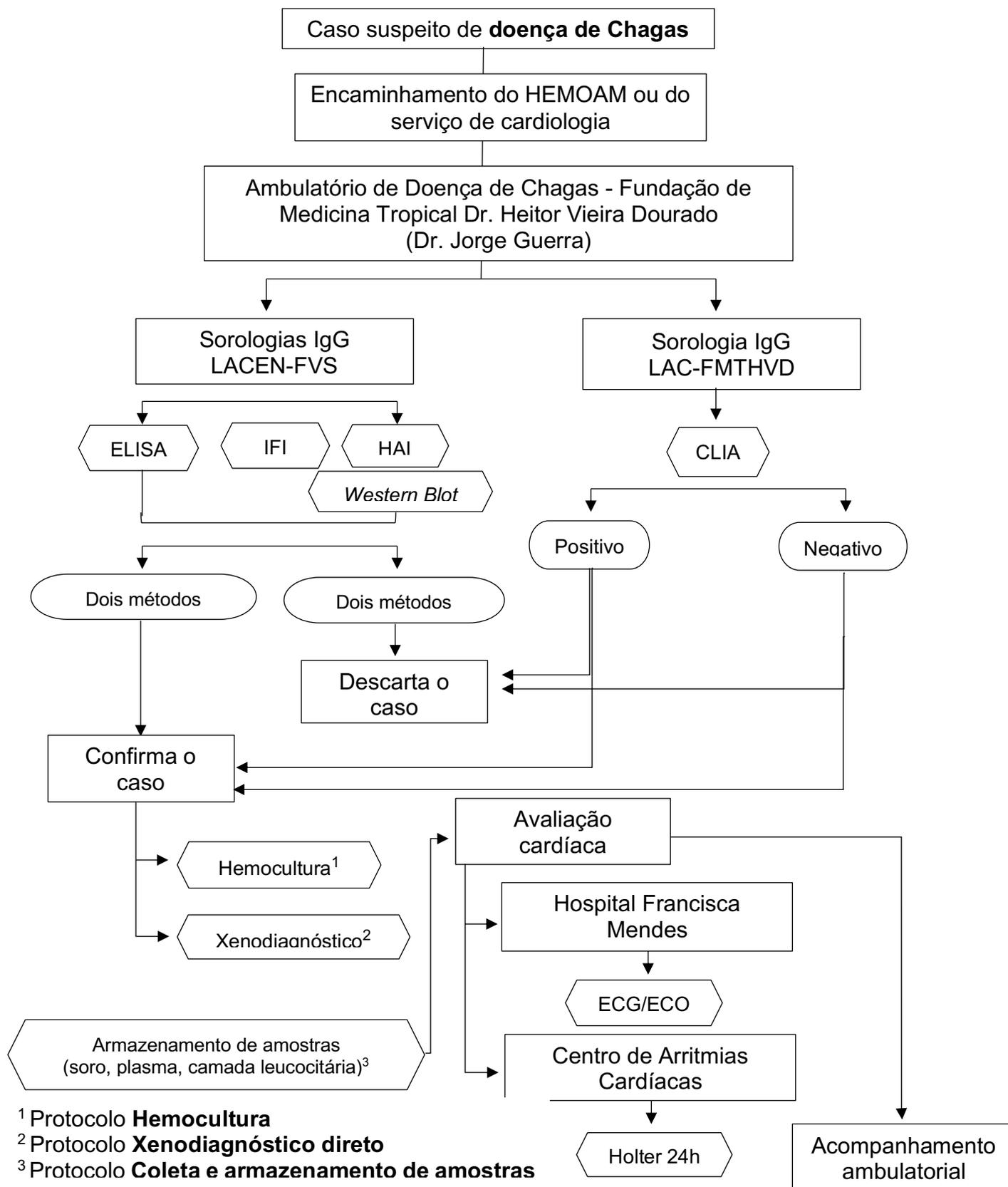
Revisão

Página

01

7

ANEXO II



COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA E CRÔNICA.

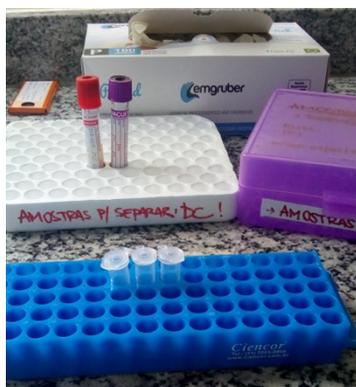
Revisão

Página

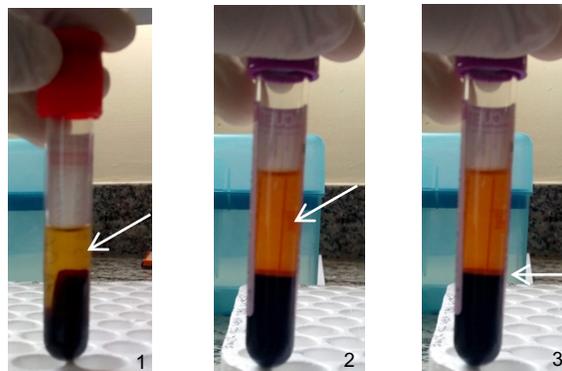
01

8

ANEXO III



Etapa 1: Separar três microtubos e identificar.



Etapa 2: Do tubo vermelho separar o soro (1), do tubo roxo separar o plasma (2) e o "buffy coat" (3).



Etapa 3: Guardar as amostras na caixa identificada



Etapa 4: Armazenar os microtubos no Freezer 1, Gaveta 1. Sala de Imunologia.

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP		
TÍTULO: EXTRAÇÃO DE DNA POR KIT UTILIZANDO PURELINK KIT® (INVITROGEN)		
Elaborado por: Débora Raysa T. de Sousa	Revisado e aprovado por: Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra Dra. Rosa Amélia G. Santana	Data de aplicação 25 de abril de 2019 Data da próxima revisão 25 de abril de 2020

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento para extração de DNA de *Trypanosoma cruzi* a partir da camada leucoplaquetária (*buffy coat*), cultura, vetor ou fezes, intestino do vetor e material no papel de filtro.

2. DEFINIÇÕES

Extração: é o isolamento da molécula de DNA a partir de material biológico.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial complementar.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável técnico, alunos de doutorado, e de mestrado. Alunos de iniciação científica devem ser acompanhados.

5. POP'S RELACIONADOS

POP_ENT_GPDC_001: Biossegurança e Gerenciamento Ambiental.

POP_ENT_GPDC_008: Coleta e armazenamento de amostras biológicas de pacientes com diagnóstico de doença de Chagas aguda e crônica.

POP_ENT_GPDC_018: POP_ENT_GPDC_018: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* - Protocolo COII (Gene que codifica a subunidade II da citocromo oxidase).

EXTRAÇÃO DE DNA POR KIT UTILIZANDO PURELINK KIT® (INVITROGEN)	Revisão	Página
	01	2

POP_ENT_GPDC_019: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*- Protocolo GPI (Gene da glicose-fosfato isomerase).

POP_ENT_GPDC_020: Protocolo de purificação para o sequenciamento: Precipitação de produto da PCR com Polienoglicol (PEG).

POP_ENT_GPDC_021: Protocolo de reação de sequenciamento para analisador automático ABI 310 (sequenciador).

6. EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Jaleco, luvas, máscara, touca

7. RECURSOS NECESSÁRIOS

7.1. Amostra

7.1.1. Cama leucoplaquetária (*buffy coat*), cultura, vetor ou fezes, intestino do vetor e material no papel de filtro.

7.2. Materiais

7.2.1. Microtubo (Eppendorf) de 1,5 mL.

7.2.2. Ponteiras descartáveis com filtro, em suporte apropriado.

7.2.3. Pipetal de 2 µL, 10 µL, 100 µL e 1000 µL.

7.2.4. Caixa de descarte de material com hipoclorito de sódio.

7.2.5. Frasco lavador com álcool 70%.

7.3. Equipamentos

7.3.1. Centrífuga

7.3.2. Banho-maria e termômetro (56°C)

7.3.3. Agitador de tubos (Vortex)

7.4. Reagentes, meios e soluções

7.4.1. PureLink Kit® (Invitrogen) – Genomic Digestion Buffer, Genomic Lysis/Binding Buffer, Wash Buffer 1 e 2, Genomic Elution Buffer, Proteinase K, RNase A.

7.4.2. PBS (Phosphate-buffered saline) pH 7,2.

7.4.3. Etanol 96-100%.

EXTRAÇÃO DE DNA POR KIT UTILIZANDO PURELINK KIT® (INVITROGEN)	Revisão 01	Página 3
--	---------------	-------------

8. PROCEDIMENTOS

8.1. Informações importantes antes de iniciar os procedimentos

Vários procedimentos devem ser seguidos para evitar a contaminação das amostras submetidas a PCR:

- *Limpar a bancada onde irá trabalhar e as pipetas que irão utilizar com hipoclorito de sódio e álcool 70% antes e depois do procedimento.
- *Empregar materiais de consumo novos (não reciclados).
- *Distribuir os reagentes em pequenas alíquotas, incluído o kit com a enzima.
- *Utilizar apenas ponteiras protegidas por filtros.
- *Empregar tubos tipo Eppendorf que apresentem um sistema de lacre para evitar extravasamento de amostras durante a homogeneização.
- *Todo o material permanente deverá ser limpo com hipoclorito de sódio e submetido à luz UV.
- *Durante toda a execução da técnica, usar luvas que deverão ser descartadas a cada contaminação por amostra ou quando achar necessário.

8.2. Material: camada leucoplaquetária (*buffy coat*), cultura

Obs: Retirado do Manual da PureLink Genomic DNA Kits® (Invitrogen): Blood Lysate.

- 8.2.1. Em um microtubo (Eppendorf), adicionar 200 µL do material (se < 200 µL, completar com PBS);
- 8.2.2. Adicionar 20 µL de Proteinase K;
- 8.2.3. Adicionar 20 µL de RNAse A, vortexar e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos;
- 8.2.4. Adicionar 200 µL do Genomic Lysis/Binding Buffer e vortexar para obter uma solução homogênea;
- 8.2.5. Incubar a 55°C por 10 minutos;
- 8.2.6. Adicionar 200 µL de etanol (96-100%), vortexar por 5 segundos;
- 8.2.7. *Utilizar a coluna e o tubo coletor;*
- 8.2.8. Adicionar aproximadamente 640 µL do lisado (cuidade com a esponja da coluna!);
- 8.2.9. Centrifugar a coluna a uma velocidade de 10 000 x g (ou 10 350 rpm) por 1 minuto;
- 8.2.10. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna em um novo tubo coletor;

EXTRAÇÃO DE DNA POR KIT UTILIZANDO PURELINK KIT® (INVITROGEN)	Revisão 01	Página 4
--	---------------	-------------

- 8.2.11. Adicionar 500 µL de Wash Buffer 1 (observar se está preparado);
- 8.2.12. Centrifugar a coluna a uma velocidade de 10 000 x g (ou 10 350 rpm) por 1 minuto;
- 8.2.13. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna em um novo tubo coletor;
- 8.2.14. Adicionar 500 µL de Wash Buffer 2 (observar se está preparado);
- 8.2.15. Centrifugar a coluna em velocidade máxima por 3 minutos;
- 8.2.16. Colocar a coluna em um novo microtubo (Eppendorf);
- 8.2.17. Adicionar mais 25 µL - 200 µL do Genomic Elution Buffer na coluna;
- 8.2.18. Centrifugar a coluna em velocidade máxima por 2 minutos;
- 8.2.19. O microtubo (Eppendorf) contém o DNA purificado, remover e descartar a coluna;
- 8.2.20. Armazenar o DNA extraído em freezer a -20°C.

8.3. Material: Vetor e fezes com intestino do vetor

Obs: Retirado do Manual da PureLink Genomic DNA Kits® (Invitrogen):
Mammalian tissue and mouse/rat tail lysate.

- 8.3.1. Utilizar ¼ do vetor, remover e descartar as pernas;
- 8.3.2. Adicionar 90 µL do Genomic Digestion Buffer e macerar;
- 8.3.3. Adicionar mais 90 µL do Genomic Digestion Buffer ao macerado;
- 8.3.4. Adicionar 20 µL de Proteinase K;
- 8.3.5. Incubar a 55°C de 4 a 24 horas.
- 8.3.6. Centrifugar em velocidade máxima por 3 minutos,
- 8.3.7. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo (Eppendorf);
- 8.3.8. *Seguir os mesmos procedimentos desde o item 8.1.3.*

8.4. Material: Papel de filtro com material

Obs: Retirado do Manual da PureLink Genomic DNA Kits® (Invitrogen): Blood spots.

- 8.4.1. Cortar 2-5 pedaços de papel filtro cada 2-3mm e adicionar em um microtubo (Eppendorf);
- 8.4.2. Adicionar 90 µL do Genomic Digestion Buffer e macerar;
- 8.4.3. Adicionar mais 90 µL do Genomic Digestion Buffer ao macerado;
- 8.4.4. Adicionar 20 µL de Proteinase K;

EXTRAÇÃO DE DNA POR KIT UTILIZANDO PURELINK KIT® (INVITROGEN)	Revisão 01	Página 5
--	---------------	-------------

8.4.5. Incubar a 55°C por 30 minutos;

8.4.6. Centrifugar em velocidade máxima por 2-3 minutos,

8.4.7. Transferir todo o líquido para um novo microtubo (Eppendorf);

8.4.8. *Seguir os mesmos procedimentos desde o item 8.1.3.*

9. PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

Livro de protocolo do fabricantes do Kit Invitrogen.

10. LIMITAÇÕES

10.1. O material para de sangue ou cultura, para ser extraído devem ter no mínimo 200 µL;

10.2. Protocolos de extração por kit geralmente perdem mais DNA no processo de purificação do DNA do que protocolos de extração utilizando métodos caseiros.

11. REFERÊNCIAS

1. Schaefer R. Técnicas em Biologia Molecular. Embrapa. 2006.

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP		
TÍTULO: REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> – PROTOCOLO DO GENE QUE CODIFICA A SUBUNIDADE II DA CITOCROMO OXIDASE (COII).		
Elaborado por: Laylah Kelre Magalhães Débora Raysa T. de Sousa	Revisado e aprovado por: Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra Dr. Henrique Silveira Dra. Rosa Amélia G. Santana	Data de aplicação 25 de abril de 2019 Data da próxima revisão 25 de abril de 2020

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento da PCR – protocolo COII utilizado para o diagnóstico complementar da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e diferenciação de linhagens TcI, TcII e Zimodema 3 (Z3).

2. DEFINIÇÕES

Reação em cadeia da polimerase: técnica molecular que permite a amplificação de pequenas quantidades de um DNA específico a partir de um molde de DNA, por meio de uma reação enzimática, na ausência de um organismo vivo.

Iniciador ou primer: pequena sequência de DNA ou RNA a partir da qual pode se iniciar a replicação do DNA.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial complementar.

4. RESPONSABILIDADES

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> – PROTOCOLO COII.	Revisão	Página
	01	2

Gerente da unidade, responsável técnico, alunos de doutorado, e de mestrado. Alunos de iniciação científica devem ser acompanhados.

5. POP'S RELACIONADOS

POP_ENT_GPDC_001: Biossegurança e Gerenciamento Ambiental.

POP_ENT_GPDC_008: Coleta e armazenamento de amostras biológicas de pacientes com diagnóstico de doença de Chagas aguda e crônica.

POP_ENT_GPDC_014: Extração de DNA por kit utilizando PureLink Kit® (Invitrogen).

POP_ENT_GPDC_018: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* - Protocolo COII (Gene que codifica a subunidade II da citocromo oxidase).

POP_ENT_GPDC_019: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* - Protocolo GPI (Gene da glicose-fosfato isomerase).

POP_ENT_GPDC_020: Protocolo de purificação para o sequenciamento: Precipitação de produto da PCR com Polienoglicol (PEG).

POP_ENT_GPDC_021: Protocolo de reação de sequenciamento para analisador automático ABI 310 (sequenciador).

6. EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Jaleco, luvas, máscara, touca.

7. RECURSOS NECESSÁRIOS

7.1 Amostra

7.1.1. DNA extraído (conforme POP Extração de DNA)

7.2 Materiais

7.2.1. Microtubo (Eppendorf) de 0,2 mL e 1,5 mL.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> – PROTOCOLO COII.	Revisão	Página
	01	3

7.2.2. Ponteiras descartáveis com filtro, em suporte apropriado.

7.2.3. Pipetal de 2 µL, 10 µL, 100 µL e 1000 µL.

7.2.4. Caixa de descarte de material com hipoclorito de sódio.

7.2.5. Frasco lavador com álcool 70%.

7.2.6. Erlenmeyer (100mL).

7.2.7. Proveta (100mL).

7.3 Equipamentos

7.3.1. Termociclador

7.3.2. Fonte de eletroforese

7.3.3. Agitador de tubos (Vortex)

7.3.4. Microondas

7.4 Reagentes, meios e soluções

7.4.1. Frasco com água ultrapura (H₂O UP).

7.4.2. Buffer de PCR 10x.

7.4.3. MgCl₂ 50mM.

7.4.4. Nucleotídeos dATP + dCTP + dTTP + dGTP 10mM.

7.4.5. Primer: TcMit 31 (5' – TAAATAATATATATTGTACATGAG- 3') 50mM.

7.4.6. Primer: TcMit 40 (5' – CTCATTGYCCATATATTGT- 3') 50mM.

7.4.7. Enzima Taq polimerase (Taq Polymerase Platinum) 5U.

7.4.8. Marcador de peso molecular (Diluir o marcador: 40 µL de água destilada + 10 µL de tampão de corrida + 10 µL do marcador de peso molecular).

7.4.9. Solução tampão para eletroforese (Diluir o TBE 10X para 1X: 100mL de TBE 10X + 900mL de água destilada).

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> – PROTOCOLO COIL.	Revisão	Página
	01	4

7.4.10. Tampão de corrida.

7.4.11. Brometo de etídeo.

8. PROCEDIMENTOS

8.1 Informações Importantes antes de iniciar os procedimentos

Vários procedimentos devem ser seguidos para evitar a contaminação das amostras submetidas a PCR:

*Limpar a bancada onde irá trabalhar e as pipetas que irão utilizar com hipoclorito de sódio e álcool 70% antes e depois do procedimento.

*Empregar materiais de consumo novos (não reciclados).

*Distribuir os reagentes em pequenas alíquotas, incluído o kit com a enzima.

*Utilizar apenas ponteiras protegidas por filtros.

*Empregar tubos tipo Eppendorf que apresentem um sistema de lacre para evitar extravasamento de amostras durante a homogeneização.

*Todo o material permanente deverá ser limpo com hipoclorito de sódio e submetido à luz UV.

*Durante toda a execução da técnica, usar luvas que deverão ser descartadas a cada contaminação por amostra ou quando achar necessário.

8.2 Mix da reação (PCR)

Obs. 1: As quantidades fornecidas a seguir correspondem a valores empregados para uma única amostra de DNA.

Obs. 2: A cada reação incluir uma alíquota de amostra comprovadamente positiva, além do controle negativo (apenas o mix).

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> – PROTOCOLO COII.	Revisão	Página
	01	5

8.1.1. Em um microtubo (Eppendorf), acrescentar os seguintes produtos:

Reagentes	Quantidade (µL)
H ₂ O	36,30
Buffer de PCR 10x	5,00
MgCl ₂	1,50
dNTP	1,00
TcMit 31	0,50
TcMilt 40	0,50
Taq DNA Polimerase	0,20
Total	45,00
DNA	5,00

Obs. 3: Adicionar os reagentes na ordem do maior volume para o menor, deixando a Taq polimerase por último. A mistura deve ser realizada o tempo todo no gelo.

8.1.2. Após homogeneização, transferir 45 µL da mistura anterior para um microtubo (Eppendorf) de 0,2 µL.

8.1.3. Adicionar 5 µL do DNA extraído.

8.3 Ciclos térmicos

8.2.1. Introduzir os tubos do termociclador, programado para os seguintes ciclos de temperatura e tempo:

95°C	5 min	1X
95°C	30 seg	35X
48°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1X
4°C	infinito	

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> – PROTOCOLO COII.	Revisão	Página
	01	6

8.4 Controles

8.3.1. A cada reação adicionar uma amostra comprovadamente positiva e uma negativa (um Eppendorf com apenas um mix)

8.4 Eletroforese em gel de agarose

8.4.1. Para fazer um Gel 2%: pesar 2g de agarose; medir em uma proveta 100mL de TBE; adicionar em um erlenmeyer a agarose + TBE; levar ao micro-ondas até diluir (aparência límpida).

8.4.2. Montar uma placa molde com um pente para formar os poços no gel;

8.4.3. Adicionar à mistura 5 µL de brometo de etídeo e logo, colocar essa mistura na placa e aguardar a polimerização;

8.4.4. Colocar a placa com gel na cuba de eletroforese;

8.4.5. Adicionar o tampão de eletroforese (TBE 1X);

8.4.6. Misturar 2 µL de tampão de corrida e 5 µL de DNA amplificado em cada poço no gel;

8.4.7. No primeiro poço, aplicar 5 µL da solução diluída do marcador de peso molecular;

8.4.8. Promover uma corrida de aproximadamente 40 minutos a 100V (volts) e 90 A (ampêres) de corrente.

8.5 Revelação

8.5.1. Fazer a leitura do gel no Transiluminador-UV;

8.5.2. A visualização de uma única banda de peso molecular 420 pb indicará a presença de DNA de *Trypanosoma cruzi* amplificado (PCR positiva)

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> – PROTOCOLO COIL.	Revisão	Página
	01	7

9. LIMITAÇÕES

- 10.1. Deve-se manter o material no gelo, pois pode haver degradação do DNA;
- 10.2. Deve-se manter os reagentes no gelo para manter a estabilidade.
- 10.3. A PCR é uma técnica muito sensível e deve-se tomar muito cuidado para não contaminar as amostras.
- 10.4. Deve-se ter em cada reação uma amostra de controle positivo (amostra de cultura positiva) e uma amostra de controle negativo (reagentes sem amostra, apenas água ultrapura).

10. REFERÊNCIAS

1. Ávila HÁ, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: Diagnosis of chronic Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 48:211-22.
2. Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SD, Galvão LM, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 1998; 88: 28- 33.
3. Sturm NR, Degraeve W, Morel CM, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequence: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 33: 205-14

11. ANEXOS

Não se aplica.

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP		
TÍTULO: PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO PARA O SEQUENCIAMENTO: PRECIPITAÇÃO DO PRODUTO DA PCR COM POLIENOGLICOL (PEG).		
Elaborado por: George Allan Silva Adaptado por: Débora Raysa T. de Sousa	Revisado e aprovado por: Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra Dr Henrique Silveira Dra. Rosa Amélia G. Santana	Data de aplicação 25 de abril de 2019 Data da próxima revisão 25 de abril de 2020

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento da purificação do produto da PCR antes de ir para o sequenciamento.

2. DEFINIÇÕES

A precipitação com Polietilenoglicol (PEG) atua como método de purificação da PCR com objetivo de remoção de oligos e nucleotídeos não incorporados na PCR que poderiam interferir na reação de sequenciamento. Apresenta um bom rendimento, podendo utilizar somente 0,5-1µL da amostra na reação de sequenciamento. O método não é recomendado para PCR com bandas inespecíficas ou com primer dímeros.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial de pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO PARA O SEQUENCIAMENTO: PRECIPITAÇÃO DO PRODUTO DA PCR COM POLIENOGLICOL (PEG).	Revisão 01	Página 2
--	-------------------	-----------------

5. POP'S RELACIONADOS

POP_ENT_GPDC_014: Extração de DNA por kit utilizando PureLink Kit® (Invitrogen).

POP_ENT_GPDC_017: Procedimentos da PCR (reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* – Protocolo Multiplex

POP_ENT_GPDC_018: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* - Protocolo COII (Gene que codifica a subunidade II da citocromo oxidase).

POP_ENT_GPDC_019: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* - Protocolo GPI (Gene da glicose-fosfato isomerase).

POP_ENT_GPDC_021: Protocolo de reação de sequenciamento para analisador automático ABI 310 (sequenciador).

6. EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Touca descartável, luvas de látex, máscara descartável, jaleco

7. RECURSOS NECESSÁRIOS

7.1. Solução PEG (20% w/v PEG, 2,5M NaCl)

10g de Polietilenoglicol 8000

7,3g de NaCl

Adicione 35 mL de ddH₂O

Agite para solubilizar o PEG durante 20 minutos, ou até o mesmo encontre-se solúvel. Após, complete o volume para 50 mL com ddH₂O.

7.2. Antes de iniciar o procedimento:

7.2.1. Armazene o etanol 80% a -20°C;

7.2.2. Programe o banho-maria ou banho seco (termobloco) a 37°C.

7.3. Procedimento:

7.3.1. Identificar os tubos 1,5 mL;

7.3.2. Adicionar PEG (20%) nos tubos identificados. O mesmo volume a ser utilizado da PCR (20 µL de PEG - 20 µL de amostra);

Obs: antes de transferir o PEG realize a homogeneização do mesmo.

PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO PARA O SEQUENCIAMENTO: PRECIPITAÇÃO DO PRODUTO DA PCR COM POLIENOGLICOL (PEG).	Revisão 01	Página 3
--	---------------	-------------

- 7.3.3. Agite suavemente em vórtex por 5 segundos e dar um breve spin (centrifugação);
- 7.3.4. Incubar a 37°C por 15 minutos no termobloco;
- 7.3.5. Após incubação, centrifugar a 2500 rcf (6.000 rpm) por 15 minutos a temperatura ambiente;
- 7.3.6. Descartar o sobrenadante e secar até retirar todo o PEG (bater o tubo de cabeça para baixo);
- 7.3.7. Adicionar 125µL de etanol 80% gelado e em seguida centrifugue a 1450 rcf (4.500 rpm) por 2 minutos;
- 7.3.8. Descarte o sobrenadante e deixar o tubo bem seco (bater o tubo de cabeça para baixo) para remoção de resíduos de etanol;
- 7.3.9. Incubar a 60° C no termobloco por 10 minutos de tampa aberta para remover resíduos de etanol (certificar a ausência de resíduos de etanol);
- 7.3.10. Adicionar água ultrapura morna, sendo adicionado o mesmo volume inicial da PCR;
- 7.3.11. Agite em vórtex por 5 segundos e armazenar amostra a -20°C

Obs: Antes do armazenamento da amostra a -20°C armazenar a 4-5°C por uma hora para melhor eluição do DNA.

8. LIMITAÇÕES

Não se aplica

9. REFERÊNCIAS

1. Silva, GAV; Ramasawmy, R; Boechat, AL, et al. Association of TNF À 1031 C / C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, Brazil. Human. Immunology. 2015;76, (2-3):137- 141.
2. Silva, GAV; Barletta-Naveca, RH; Carvalho BKS, et al. Haplotype of the Promoter Region of TNF Gene May Mark Resistance to Tuberculosis in the Amazonas State, Brazil. Journal of Clinical & Cellular Immunology. 2016; 7, (3): 1-6.

10. ANEXOS

Não se aplica.

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP		
TÍTULO: PROTOCOLO DE REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PARA ANALISADOR AUTOMÁTICO ABI 310 (SEQUENCIADOR).		
Elaborado por: George Allan Silva Laylah Kelre Magalhães Adaptado por: Débora Raysa T. de Sousa	Revisado e aprovado por: Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra Dr. Henrique Silveira Dra. Rosa Amélia G. Santana	Data de aplicação 25 de abril de 2019 <hr/> Data da próxima revisão 25 de abril de 2020

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento da reação de sequenciamento utilizando o sequenciador automático ABI 310.

2. DEFINIÇÕES

O sequenciamento de DNA é o processo realizado após a PCR e é o processo realizado para se determinar a sequência exata de nucleotídeos em uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico). Isso possibilita identificar o organismo ao qual pertence uma amostra e diferenciar cepas de microrganismos patogênicos.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial de pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

PROTOCOLO DE REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PARA ANALISADOR AUTOMÁTICO ABI 310 (SEQUENCIADOR).	Revisão 01	Página 2
---	---------------	-------------

5. POP'S RELACIONADOS

POP_ENT_GPDC_014: Extração de DNA por kit utilizando PureLink Kit® (Invitrogen).

POP_ENT_GPDC_017: Procedimentos da PCR (reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* – Protocolo Multiplex

POP_ENT_GPDC_018: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* - Protocolo COII (Gene que codifica a subunidade II da citocromo oxidase).

POP_ENT_GPDC_019: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* - Protocolo GPI (Gene da glicose-fosfato isomerase).

POP_ENT_GPDC_020: Protocolo de purificação para o sequenciamento: Precipitação de produto da PCR com Polienoglicol (PEG).

6. EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Jaleco, calçado fechado, máscara, luvas, touca

7. RECURSOS NECESSÁRIOS

7.1. Materiais necessários

7.1.1-Tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL

7.1.2- Ponteiros descartáveis com filtro em suporte apropriado

7.1.3- Pipetas de 2, 10, 100 e 1.000 µL

7.1.4-Caixa de descarte de material com hipoclorito de sódio

7.1.5- Placa de sequenciamento

7.1.6- Fita seladora de placas de sequenciamento

7.2. Reagentes necessários

7.2.1- Kit de reagentes de sequenciamento BigDye Terminator 3.1 (Buffer 5X e BigDye)

7.2.2- EDTA 125mM

PROTOCOLO DE REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PARA ANALISADOR AUTOMÁTICO ABI 310 (SEQUENCIADOR).	Revisão	Página
	01	3

7.2.3- Acetato de sódio a 3M

7.2.4- Etanol 70%

7.2.5- Formamida HI-DI (Highly deionized- Altamente deionizada)

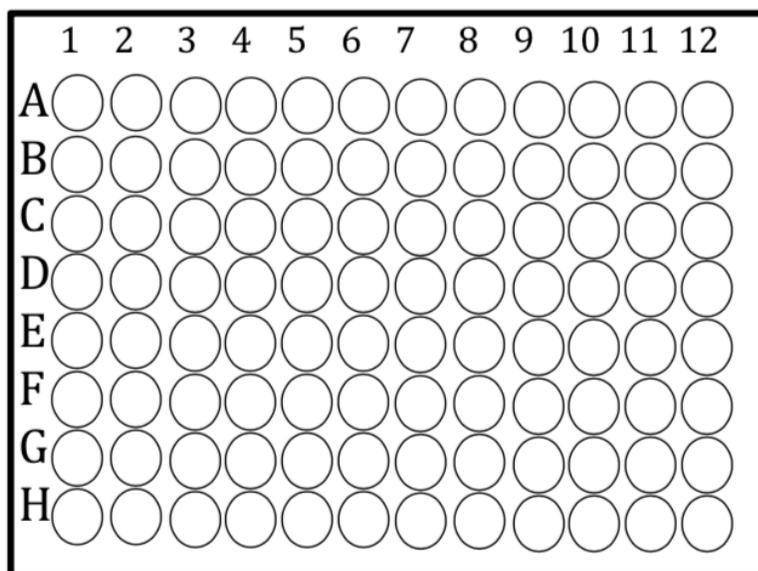
8. PROCEDIMENTOS

8.1. Preparação do Mix

- Separar todo material necessário

-Assepsia da bancada

Preparar uma mistura com os reagentes (mix) abaixo (exceto e amostra) e aplicar em tubos 0,2 μ L ou placa de 96 poços. Adicionar a amostra em cada tubo ou poço.



8.1. 1. Placa com 96 poços

Reagentes do Mix	Quantidade 1x*
Água ultrapurapura**	3,7 μ L
Buffer 5X (Save Money)	2 μ L
Primer (3,3 μ M)	1 μ L
Big Dye	0,3 μ L

PROTOCOLO DE REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PARA ANALISADOR AUTOMÁTICO ABI 310 (SEQUENCIADOR).	Revisão	Página
	01	4

Volume do Mix***	7 µL
Amostra (produto da PCR purificado)	3 µL
Volume Total do Mix	10µL

*Quantidade para uma amostras - pode alterar conforme a quantidade de amostras.

**A água é o reagente que altera a quantidade para que o volume final do mix + amostra seja 10 µL.

*** Muda dependendo da quantidade de amostra utilizado.

8.1.2. Depois de colocar o mix e as amostras na placa, é necessário selar a placa com a fita seladora de placas de sequenciamento e levar a placa ao termociclador;

8.1.3. Introduzir os tubos no termociclador, programado para os seguintes ciclos de temperatura e tempo:

95°C	1 min	1X
95°C	15 seg	15X
55°C	10 seg	
60°C	1:15 min	
95°C	15 min	5X
55°C	10 seg	
60°C	1:30 min	
95°C	15 seg	5X
55°C	10 seg	
60°C	2min	
4°C	infinito	

8.2. Após terminar a reação no termociclador

8.2.1. Remover a placa do termociclador e encaminhar para a centrífuga por 2 minutos, 2000 RCF a 4°C;

Obs: A placa deve sempre estar envolvida com o papel alumínio, para evitar a luz.

8.2.2. Após a centrifugação, misturar na mesma proporção o EDTA 125mM e o acetato de sódio a 3M (ph 5,2). Adicionar em cada poço o EDTA e o acetato de sódio (1 µL de acetato + 1 µL de EDTA= 2 µL mix).

Ex: 700µL de EDTA e 700µL de acetato de sódio

8.2.3. Adicionar 25 µL de etanol 100% gelado a cada um dos poços;

8.2.4. Selar a placa com strips e misturar por inversão (4x), misturar manualmente;

PROTOCOLO DE REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PARA ANALISADOR AUTOMÁTICO ABI 310 (SEQUENCIADOR).	Revisão	Página
	01	5

8.2.5. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo de luz e envolver a placa com papel alumínio;

8.2.6. Após o período de incubação centrifugar por 45 minutos a 4°C a 2000 RCF ou 3000 RCF por 30 minutos;

Importante: O próximo passo deve ser feito imediatamente. Se isto não for possível. Fazer um spin na placa por +2 minutos, antes de iniciar a próxima etapa.

8.2.7. Inverter a placa manualmente e fazer um spin até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida à placa da centrífuga;

Obs: A inversão desta placa deve ser manual, sobre a pia, com um só movimento rápido, para evitar contaminação dos poços. Com a placa invertida sobre o papel toalha bata delicadamente por 8X, para retirar o excesso de etanol e fazer um spin de 1 minuto.

8.2.8. Adicionar 35 µL de etanol a 70% em cada um dos poços;

Obs: Utilizar pipeta multicanal.

8.2.9. Centrifugar por 15 minutos a 4°C e 1650 RCF;

8.2.10. Inverter a placa manualmente e fazer um spin até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida à placa centrífuga;

Obs: A inversão desta placa deve ser manual, sobre a pia, com um só movimento rápido, para evitar contaminação dos poços. Com a placa invertida sobre o papel toalha bater delicadamente por 8X, para retirar o excesso de etanol e fazer um spin de 1 minuto.

8.2.11. Incubar a placa a 52°C por 15 minutos;

Obs: Cobrir a placa somente com papel alumínio em forma de cabana (no próprio termociclador com a tampa aberta).

Importante: Caso não for colocar a placa no sequenciador imediatamente, com a placa seca, colocar o selo, envolver com o papel alumínio para protegê-la da luz e congele.

8.2.12. Acrescentar em cada poço 10µL de formamida HI-DI, lavando as paredes dos poços. Selar e fazer um spin;

Obs: Tentar utilizar somente uma unidade de ponteira, de forma que não entre em contato com poço.

PROTOCOLO DE REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PARA ANALISADOR AUTOMÁTICO ABI 310 (SEQUENCIADOR).	Revisão	Página
	01	6

8.2.13. Aquecer a placa 95°C por 1 minuto e depois mais 1 minuto no gelo, em seguida enviar a placa para o sequenciador.

Obs: Sempre colocar a placa em par, pois os capilares fazem a leitura em par.

9. LIMITAÇÕES

Não se aplica

10. REFERÊNCIAS

- 1- Nonohay, JS; Hepp, D. Técnicas e análises de Biologia Molecular. Biotecnologia II. Capítulo 1, 1-23. Disponível em:
http://srvd.grupoa.com.br/uploads/imagensExtra/legado/B/BRUNO_Alessandra_Nejar/Biotecnologia_II/Lib/Amostra.pdf.
- 2- Silva, GAV; Ramasawmy, R; Boechat, AL, et al. Association of TNF À 1031 C / C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, Brazil. Human. Immunology. 2015;76, (2-3):137- 141.

11. ANEXOS

Não se aplica

		PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP			Página 1 de 4
Código POP_PROT_01	Data Emissão Dezembro/2018	Data de Vigência 01/12/2018	Próxima Revisão Dezembro/2019	Versão N° 001	
Elaborado por: Rafael Ávila e Jessica Ortiz		Revisado e Aprovado por: Dr. Norival Kesper Júnior			
ÁREA: LABORATÓRIO DE PROTOOZOLOGIA – INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO					
ASSUNTO: Protocolo de realização de imunoblotting a partir de antígenos excretados-secretados de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TESA blot).					

OBJETIVO

É objetivo deste documento estabelecer um padrão de preparação das membranas de nitrocelulose para realização do teste confirmatório: imunoblotting, para o diagnóstico da doença de Chagas.

APLICAÇÃO

Este POP aplica-se aos técnicos e a todos os alunos envolvidos com projetos sobre diagnóstico sorológico para doença de Chagas do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

PROCEDIMENTOS

1. Preparação da membrana de nitrocelulose.

- 1.1. Pegar material na caixa de isopor, preparar bancada (colocar papel para proteção);
- 1.2. Limpar vidros com álcool e secar;
- 1.3. Montar placas: maior atrás, menor na frente – colocar o espaçador e alinhar bem em baixo para não vazar. Por último, no lado maior, apertar os parafusos e prender no lado menor;
- 1.4. Medir tamanho do gele e marcar no vidro;
- 1.5. Usar a receita para 7% (a receita está na parede do lado esquerdo) e preparar no pote separação;
- 1.6. Homogeneizar rotacionando;
- 1.7. Despejar até um pouco acima da marca;
- 1.8. Gotas de álcool (butanol);
- 1.9. *Aguardar aproximadamente 20 minutos;*

		PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP			Página 2 de 4
Código POP_PROT_01	Data Emissão Dezembro/2018	Data de Vigência 01/12/2018	Próxima Revisão Dezembro/2019	Versão Nº 001	
Elaborado por: Rafael Ávila e Jessica Ortiz		Revisado e Aprovado por: Dr. Norival Kesper Júnior			
ÁREA: LABORATÓRIO DE PROTOOZOLOGIA – INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO					
ASSUNTO: Protocolo de realização de immunoblotting a partir de antígenos excretados-secretados de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TESA blot).					

- 1.10. Após solidificar, lavar várias vezes (5x) com água destilada para remover o butanol;
- 1.11. Secar com papel filtro sem encostar no gel;
- 1.12. Fazer o empilhamento, usar receita (parece do lado esquerdo);
- 1.13. Colocar pente;
- 1.14. *Deixar secar (se não for usar, cobrir e guardar na geladeira);*
- 1.15. Preparar os antígenos (diluição da amostra 1:5. Ex: 400µL de antígeno e 100µL de tampão de amostra 5x);
- 1.16. Homogeneizar e colocar tampinha;
- 1.17. Ferver 100°C por 5min;
- 1.18. Tirar pente e placa;
- 1.19. Montar suporte de eletroforese;
- 1.20. Colocar solução de corrida 1x no meio, até o topo e dos lados até passar o fio;
- 1.21. Homogeneizar e pipetar com ponteira especial entre as placastodo o antígeno;
- 1.22. Conectar os fios e ligar em 110V até alinhar;
- 1.23. Quando a linha afinar, aumentar para 165V (ou, aumentar conforme progressão da corrida – parar a corrida um pouco a baixo da “borracha cinza”;
- 1.24. Deixar de molho as esponjas e a membrana de nitrocelulose no tampão de transferência. Antes de terminar a corrida, cortar a lateral da membrana e marcar A ou B;
- 1.25. Abrir a placa;
- 1.26. Retirar o gel de empilhamento;
- 1.27. Se o gel ficar na placa maior = aplicar direto. Se o gel ficar na placa menor = virar ao aplicar;
- 1.28. Montar 2 esponjas, nitrocelulose, gel, terminar com 2 esponjas e alinhas com o Becker que não ocorram bolhas;
- 1.29. *Ligar a máquina (66mA para 2 papeis) por 1 h --- Peso molecular;*

		PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP			Página 3 de 4
Código POP_PROT_01	Data Emissão Dezembro/2018	Data de Vigência 01/12/2018	Próxima Revisão Dezembro/2019	Versão N° 001	
Elaborado por: Rafael Ávila e Jessica Ortiz		Revisado e Aprovado por: Dr. Norival Kesper Júnior			
ÁREA: LABORATÓRIO DE PROTOOZOLOGIA – INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO					
ASSUNTO: Protocolo de realização de immunoblotting a partir de antígenos excretados-secretados de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TESA blot).					

- 1.30. Fazer o bloqueio com leite 5% com PBS (20 mL PBS, 1g leite);
- 1.31. Bloquear e deixar 1h no agitador --- metaperiodato/proteinase K;
- 1.32. Lavar com PBS 1x (várias vezes, 5x), depois, secar com papel filtro;
- 1.33. Marcar o pé do filme, e descartar as laterais da membrana (quando não for a de 10 pentes).

2. Processo sorológico do TESA Blot

- 2.1. Cortar as tiras que for utilizar;
- 2.2. Marcar o número da membrana das tiras cortadas;
- 2.3. Preparar o soro controle em leite 1%:

TESA ----- 1:200

Soro puro ----- 1:100

Soro glicerinado ----- 1:50

OBS. nº1: Se for usar a membrana inteira (5ml cada):

TESA ---- 5ml, 1%, 25µL.

Soro puro ----- 5ml, 1%, 50µL.

Soro glicerinado ----- 5ml, 1%, 100µL.

OBS. nº2: Se usar tira da membrana (600µL por tira)

TESA ----- 3µL.

Soro puro ----- 6µL.

Soro glicerinado ----- 12µL.

		PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP			Página 4 de 4
Código POP_PROT_01	Data Emissão Dezembro/2018	Data de Vigência 01/12/2018	Próxima Revisão Dezembro/2019	Versão N° 001	
Elaborado por: Rafael Ávila e Jessica Ortiz		Revisado e Aprovado por: Dr. Norival Kesper Júnior			
ÁREA: LABORATÓRIO DE PROTOOZOLOGIA – INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO					
ASSUNTO: Protocolo de realização de immunoblotting a partir de antígenos excretados-secretados de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TESA blot).					

- 2.4. Deixar overnight (ou mínimo 2 horas)
- 2.5. Bater a sobra e lavar com PBS (3x). Colocar no agitador por 5min, cada vez.
- 2.6. Prepara o conjugado 1:2000, em 1%;

OBS. nº1: Se for usar a membrana inteira:

- 1 membrana ----- 5ml de leite 1% e 2,5µL do conjugado
- 2 membranas ----- 10ml de leite 1% e 5µL do conjugado.

OBS. nº2: Se usar tira da membrana (600µL por tira)

Volume mínimo: 2 µL, logo preparar no mínimo 4ml = 6 tiras.

- 2.7. Homogeneizar;
- 2.8. Pipetar conjugado e colocar no agitador por 1h 30 min;
- 2.9. Lavar com PBS (3x). Colocar no agitador por 5min, cada vez;
- 2.10. Preparar o revelador;

1 receita (12ml): 4-cloro ----- 6mg
 metanol ----- 2ml
 PBS ----- 10ml
 H₂O₂ ----- 10µL

1 membrana inteira ----- 5ml de revelador

1 tira da membrana ----- 600µL de revelador

- 2.11. Aguardar e lavar com água destilada para parar o processo.

7.2. Anexo 2

Ficha Clínica-Epidemiológica



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
 FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRADOURADO
 HOSPITAL UNIVERSITÁRIO FRANCISCA MENDES



FICHA CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICA PARA A DOENÇA DE CHAGAS

Nº Registro: _____

Data: _____

Nome: _____

Data de nascimento: ____ / ____ / ____ Sexo: ____ Estado Civil: _____

Endereço: _____ Estado civil: _____

Telefone celular: (____) _____ Telefone fixo: (____) _____

1. HISTÓRICO EPIDEMIOLÓGICO

Naturalidade: _____ Rural: ____ Urbano: _____

Residência anterior (local, tipo de casa, tempo de residência): _____

Atividade atual (agricultor, extrativista): _____

Atividade(s) anterior(es): _____

Viagem para o interior/ fora da região Amazônica (local e tempo de viagem): _____

Hábito de entrar na mata (0) Não (1) Sim

Triatomíneo no domicílio (0) Não (1) Sim

Transfusão sanguínea (0) Não (1) Sim

Consumo frequente de açaí (0) Não (1) Sim

Consumo frequente de açaí (0) Não (1) Sim

2. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Queixa principal: _____

Fumante (0) Não (1) Sim

Se sim, Por quanto tempo? _____ Parou quando? _____

Bebidas alcoólicas (0) Não (1) Sim

Atividade física (0) Não (1) Sim

Doenças atuais (0) Não (1) Sim

(a) Diabetes

(b) Hipertensão arterial

(c) Outras (Citar) _____

Medicamentos atuais:

Peso: _____ kg.

Altura: _____ m.

Pulso: _____ bpm. (1) Regular (2) Irregular

Pressão arterial: _____ mmHg/ _____ mmHg

3. EXAMES COMPLEMENTARES

Sorologia anterior

PCR () _____

ELISA () _____

Imunofluorescência indireta () _____

Western Blot () _____

5. EXAME ECOCARDIOGRÁFICO

Data do exame: _____/_____/_____

Método: (1) Biplanar de Simpson
(2) Teicholz
(3) Estimada

FEVE: _____% **Dimensão do AE:** _____mm. **Diâmetro VD:** _____mm

Septo IV: _____mm. **Parede posterior:** _____mm.

DDVE: _____mm. **DSVE:** _____mm.

Alteração de contração segmentar:

- | | |
|------------------------|----------------------|
| (1) Hipocinesia difusa | (2) Acinesia |
| (3) Hipocinesia | (4) Aneurisma apical |
| (5) Outros | |

Especificar parede: _____

Regurgitação mitral:

(0) Não (1) Traços (2) Leve (3) Moderado (4) Severo

Estenose mitral: (0) Não (1) Sim

Regurgitação aórtica:

(0) Não (1) Traços (2) Leve (3) Moderado (4) Severo

Estenose aórtica: (0) Não (1) Sim

Regurgitação tricúspide:

(0) Não (1) Traços (2) Leve (3) Moderado (4) Severo

PASP (Pressão da A. pulmonar) _____mmHg.

6. EXAME HOLTER 24h

Data do exame: ____ / ____ / ____ Duração (h): _____

Nº total de QRS: _____

Ectópicos ventriculares: _____

Ectópicos supraventriculares: _____

Artefatos (%): _____

Pausas: _____

Fc mín: _____ bpm

Fc média: _____ bpm

Fc máx: _____ bpm

Arritmias ventriculares: _____

Arritmias supraventriculares: _____

OBSERVAÇÕES: _____

.

Assinatura do responsável pelo preenchimento_____
Médico e/ou Pesquisadora Responsável:

7.3. Anexo 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO FRANCISCA MENDES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TÍTULO: “PREVALÊNCIA E MORBIDADE DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA EM PACIENTES AUTÓCTONES DA AMAZÔNIA MATRICULADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO FRANCISCA MENDES”

Investigadora: JESSICA VANINA ORTIZ

Instituição: Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

Patrocinador: Edital Número 030/2013 - UNIVERSAL AMAZONAS da FAPEAM.

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo acima citado. A sua colaboração será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

O abaixo assinado ou sob responsabilidade de seu familiar abaixo identificado ou, nos casos necessários, sob a responsabilidade da investigadora ou do médico que assina este documento, declara estar ciente após ter lido ou ouvido o presente *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*.

Estou ciente que:

- I. A minha participação neste estudo que tem por finalidade “Estimar a prevalência e a morbidade da cardiopatia chagásica crônica em pacientes autóctones da Amazônia”, é voluntária, assim como na minha recusa não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios;
- II. Tenho a liberdade de desistir ou interromper a minha colaboração neste estudo a qualquer momento, sem necessidade de qualquer explicação;
- III. A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem-estar físico, e terei direito em manter sob meu poder uma via assinada deste documento;
- IV. Ao haver concordância para a participação no estudo, se procederá às seguintes condutas:
 - 1 – Preenchimento de um questionário constando de dados relativos à doença de Chagas;

- 2 – Coleta de sangue para diagnóstico da doença;
- 3 – Realização de exames complementares não invasivos do tipo (a) Eletrocardiograma de 12 derivações, (b) Exame de Holter de 24h (gravação dos batimentos cardíacos durante 24 horas), e (c) Ecocardiograma Transtorácico (Ultrassom do coração);
- 4 – Caso o diagnóstico seja dado para a Doença de Chagas, será realizado o teste de xenodiagnóstico para a pesquisa direta do parasita.
- V. Os dados relativos à doença de Chagas serão coletados utilizando a *Ficha Clínica-Epidemiológica* a ser respondida com o objetivo de estabelecer a susceptibilidade à doença;
- VI. A coleta de sangue será realizada por um profissional treinado, a partir da punção de uma veia no seu braço que irá causar uma pequena e rápida sensação de picada, com chances mínimas de complicações como: dor local, hematomas e/ou outro desconforto no local da coleta;
- VII. O eletrocardiograma de 12 derivações será realizado com a colocação de eletrodos na pele, na região do tórax com duração aproximada de 30 segundos para ser concluído, não oferecendo maiores desconfortos;
- VIII. O exame de Holter de 24h será realizado colocando eletrodos na pele que irão captar os batimentos cardíacos durante 24 horas. O exame pode causar coceira no local onde são colocados os eletrodos, caso seja alérgico, uma pomada poderá amenizar o efeito, sem causar maiores danos;
- IX. O ecocardiograma transtorácico, um ultrassom do coração, utilizará a aplicação de um gel na região esquerda do tórax e pode causar uma dor discreta local devido à pressão exercida pelo transdutor, porém se comunicado ao médico, ele pode imediatamente amenizar esse desconforto;
- X. Para o teste direto, o xenodiagnóstico, serão colocados no seu braço uma quantidade de “barbeiros” sadios, insetos que transmitem a Doença de Chagas, durante 45 minutos para identificar a presença do parasito no seu sangue e assim, procurar descobrir o tipo. Não há riscos de prejuízo à sua saúde, apenas sentirá um desconforto durante o processo da picada desses insetos;
- XI. Ao participar deste estudo obterei o benefício direto do diagnóstico da doença de Chagas e estarei contribuindo para o melhor conhecimento da prevalência e morbidade da referida doença na região amazônica. Os riscos da participação nesta pesquisa são mínimos por serem exames não invasivos, restringindo-se basicamente a riscos psicológicos que possam surgir decorrentes do processo;

- XII. Terei acesso a todos os resultados dos exames. Após o diagnóstico, caso o resultado seja positivo, terei acesso ao tratamento e ao acompanhamento gratuito na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado com o Dr. Jorge Guerra e no Hospital Universitário Francisca Mendes com o Dr. João Marcos Barbosa; assim como ao tratamento de qualquer outro possível dano decorrente da pesquisa, em que será feito o encaminhamento para o respectivo profissional;
- XIII. A participação neste estudo será confidencial e os registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo serão mostrados apenas aos participantes e aos representantes da FMT-HVD, bem como a autoridades normativas estaduais ou federais, com o objetivo de garantir informações de pesquisas clínicas ou para fins normativos. A identidade dos pacientes será mantida em confidencialidade. O patrocinador assegura que isso acontecerá de acordo com as normas legais reguladoras de proteção nacionais ou internacionais;
- XIV. O material coletado será utilizado para atender aos objetivos desta pesquisa, em caso de sobra, concordo que o mesmo seja estocado e que possa ser utilizado em estudos posteriores que envolvam o diagnóstico e o acompanhamento de casos da Doença de Chagas na Amazônia.
- XV. O (A) participante voluntário (a) e seus familiares têm direitos a ressarcimento de quaisquer gastos, tais como com transporte, alimentação e de tudo que for necessário ao estudo; e indenizações por prejuízos que porventura possam acontecer em decorrência de sua participação neste estudo, assim como de toda assistência médica garantida pela FMT-HVD, HUFM;
- XVI. O (A) participante voluntário (a) e seus familiares têm direito aos esclarecimentos que julgarem necessários a qualquer período do desenvolvimento deste estudo e serão notificados sobre qualquer nova informação relacionada. A Biomédica Jessica Vanina Ortiz, cujo número de telefone é (92) 99314-4652, terá disponibilidade integral para atender e esclarecer possíveis dúvidas dos participantes;
- XVII. Por estar devidamente esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente expresse meu consentimento para a minha inclusão como participante voluntário (a) nesta pesquisa.

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis riscos e benefícios. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa, assim como, entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando a nenhum de meus direitos legais.

Nome do paciente

Idade: _____

Sexo: F M



Impressão dactiloscópica
(p/ analfabeto)

Assinatura do paciente ou do responsável

Nome da investigadora ou médico responsável

Assinatura da investigadora ou médico responsável

Data: ____/____/____

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos desta pesquisa, você pode consultar o CEP/FMT-HVD – Comitê de Ética em Pesquisa FMT-HVD.

Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro

CEP: 69.040-000

Manaus, Amazonas

Tel.: 2127-3572 / 2127-3555

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

7.4. Anexo 4

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prevalência e morbidade da cardiopatia chagásica crônica em pacientes autóctones da Amazônia matriculados no Hospital Universitário Francisca Mendes

Pesquisador: Jessica Vanina Ortiz

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 69904017.9.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.191.571

Apresentação do Projeto:

A Doença de Chagas (DC) se manifesta em duas formas clínicas: aguda e crônica, em que a forma crônica é classificada como indeterminada, digestiva ou cardíaca. A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é uma miocardiopatia dilatada que acomete cerca de 30% dos pacientes chagásicos e clinicamente apresenta-se por: insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo. O cenário da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na região amazônica é de uma morbidade menor devido às características biológicas das linhagens TcI e TcIV em relação às regiões endêmicas, onde encontra-se a linhagem TcII. Quanto à CCC, o primeiro caso na Amazônia foi registrado em 2003, e desde então tem sido alvo de mais estudos, porém ainda escassos, com uma prevalência correspondente a 8,1% em casos autóctones. A fragilidade no diagnóstico da cardiopatia impede o conhecimento da epidemiologia na região, necessitando mais estudos afim de promover a melhora no manejo desse grupo de pacientes. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo primário avaliar a prevalência da CCC em pacientes autóctones da Amazônia com alterações sugestivas da DC e como objetivo secundário identificar a linhagem do parasita. É um estudo observacional, analítico de corte transversal que avaliará os pacientes no período de Julho de 2017 a Julho de 2018. Os pacientes serão recrutados no Hospital Universitário Francisca Mendes e as amostras processadas na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.191.571

A triagem será realizada por questionário clínico epidemiológico, o diagnóstico por métodos sorológicos e a identificação da linhagem por teste molecular. As análises estatísticas serão feitas no programa Stata versão 13.0, onde serão calculadas as frequências relativas e absolutas, a média, mediana e desvio padrão. A comparação das proporções das frequências será feita pelo teste qui-quadrado e das médias pelo teste t de Student com intervalo de confiança ao nível de 95% (IC95%). Espera-se encontrar maior prevalência de casos de DC com cardiopatia chagásica e identificar a linhagem do parasita encontrada nesses pacientes autóctones.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS

Geral

Avaliar a prevalência de cardiopatia chagásica crônica em pacientes autóctones da Amazônia

Específicos

- Correlacionar a presença de cardiopatia chagásica com variáveis clínico-epidemiológicas;
- Descrever as alterações cardíacas;
- Realizar a caracterização genética do parasita em pacientes com sorologia positiva

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos da participação nesta pesquisa são mínimos por serem exames não invasivos. A coleta de sangue implica um risco mínimo de dor local no momento da punção, hematomas e desconforto durante a coleta. Os exames cardiológicos não apresentam riscos de complicações, apenas desconforto ou alergia no local de posicionamento dos eletrodos. Os pacientes que por ventura necessitem de atendimento psicológico serão encaminhados ao Ambulatório de Psicologia do Hospital Universitário Francisca Mendes coordenado pela Psicóloga Sanderlise de Moura Rente.

Benefícios:

O benefício direto do estudo é o diagnóstico da doença de Chagas nos pacientes com alterações cardíacas e a contribuição para o melhor conhecimento da prevalência e morbidade da referida doença na região amazônica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.191.571

A proposta é relevante e dentro do contexto, é plenamente factível, portanto, devidamente instruído, está apto para análise.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo deste estudo traz a documentação: 1. Folha de rosto da CONEP; 2. Projeto gerado pela Plataforma Brasil (PB); 3. Projeto detalhado; 4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); 5. Cronograma de Execução com início previsto para 07/07/17. 6. Orçamento estimado em R\$ 4.852,00.7. Anuência da FMT-HVD (DENPE e DAM) e Hospital Universitário Francisca Mendes. 8. currículos dos pesquisadores.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

CARTA RESPOSTA DAS PENDENCIAS

Recomendações:

1. O termo autóctone refere à doença e não ao paciente. Sugerimos adequar o texto no objetivo geral.

Utilizamos o termo autóctone referindo-se ao paciente nascido na região Amazônica, pois pretendemos avaliar a prevalência nesta região sem possibilidade da infecção ter sido adquirida em outra região. Inclusive entre os critérios de exclusão ressaltamos que esses pacientes não tenham morado em outras regiões em qualquer momento da vida.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PENDÊNCIAS/SOLICITAÇÕES visando atender a Resolução no 446/2012, CNS/MS.

PENDÊNCIA 1

No tópico "avaliação dos riscos e benefícios" a pesquisadora não descreve os riscos referentes a coleta de sangue que será realizada na pesquisa. Favor incluir os riscos deste procedimento no estudo.

RESPOSTA: Foi incluído o seguinte texto no tópico "avaliação dos riscos e benefícios" da Plataforma Brasil:

"Os riscos da participação nesta pesquisa são mínimos por serem exames não invasivos. A coleta de sangue implica um risco mínimo de dor local no momento da punção, hematomas e desconforto durante a coleta. Os exames

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.191.571

cardiológicos não apresentam riscos de complicações, apenas desconforto ou alergia no local de posicionamento dos eletrodos..."

PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 2

No tópico "avaliação dos riscos e benefícios" a pesquisadora descreve a possibilidade riscos psicológicos decorrentes da realização dos exames. Favor informar no projeto local e profissional para o atendimento dos pacientes que necessitem de atendimento psicológico.

RESPOSTA: Os pacientes que por ventura necessitem de atendimento psicológico serão encaminhados ao Ambulatório de Psicologia do Hospital Universitário Francisca Mendes coordenado pela Psicóloga Sanderlise de Moura Rente.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 3

No TCLE tem a seguinte descrição: "Terei acesso a todos os resultados dos exames. Após o diagnóstico, caso o resultado seja positivo, terei acesso ao tratamento e ao acompanhamento gratuito; assim como ao tratamento de qualquer outro possível dano decorrente da pesquisa". Favor, informar o local e profissional para atendimento do paciente com resultado positivo para doença de Chagas.

RESPOSTA: O atendimento e o acompanhamento do paciente com relação à infecção pelo Trypanosoma cruzi será realizado no Ambulatório da Fundação de Medicina Tropical sob responsabilidade do Dr. Jorge Guerra. O acompanhamento cardiológico dos casos positivos será feito no Ambulatório de Miocardiopatias do Hospital Universitário Francisca Mendes sob a responsabilidade do Dr. João Marcos Barbosa. O texto no TCLE foi modificado, no item XII na página 3, da seguinte forma: "Terei acesso a todos os resultados dos exames. Após o diagnóstico, caso o resultado seja positivo, terei acesso ao tratamento e ao acompanhamento gratuito na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado com o Dr. Jorge Guerra e no Hospital Universitário

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.191.571

Francisca Mendes com o Dr. João Marcos Barbosa; assim como ao tratamento de qualquer outro possível dano decorrente da pesquisa, em que será feito o encaminhamento para o respectivo profissional"

PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 4

O cronograma apresentado refere data de início de recrutamento antes da aprovação do CEP. Favor adequar o recrutamento para ser realizado após a aprovação do CEP.

RESPOSTA: O cronograma foi modificado e adequado colocando o início do recrutamento previsto para Setembro de 2017.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 5

Não foi anexado os currículos dos pesquisadores; favor acrescentar estas informações.

RESPOSTA: O currículo dos pesquisadores foi anexado na Plataforma Brasil como documento único sob o nome "4 Currículo_Pesquisadores".

PENDÊNCIA ATENDIDA.

Diante do exposto acima, sugere-se que o protocolo seja APROVADO, visto que os pesquisadores atenderam as solicitações do CEP.

S.M.J. É o parecer

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.191.571

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_873781.pdf	18/07/2017 07:10:10		Aceito
Outros	4_Curriculo_pesquisadores.pdf	18/07/2017 00:17:59	Jessica Vanina Ortiz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	3_Projeto_detalhado.pdf	18/07/2017 00:08:30	Jessica Vanina Ortiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_TCLE.pdf	18/07/2017 00:07:55	Jessica Vanina Ortiz	Aceito
Outros	1_Respostas_pendencias.pdf	18/07/2017 00:07:33	Jessica Vanina Ortiz	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_HUFM.pdf	17/06/2017 19:53:30	Jessica Vanina Ortiz	Aceito
Outros	Termos_de_anuencia_FMT.pdf	17/06/2017 19:52:59	Jessica Vanina Ortiz	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	17/06/2017 19:50:44	Jessica Vanina Ortiz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 28 de Julho de 2017

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

7.5. Anexo 5

**Artigos completos publicados durante a
vigência do curso**

1. Batista AN, Cunha PCL, Souza LL, Guedes GPLM, Ortiz JV, Nobre MN, et al. Síndrome coronariana aguda em paciente com miocardiopatia hipertrófica e ponte miocárdica: relato de caso. *Rev Ciência Saude Amaz.* 2018; 1: 56-63.
2. Petruccelli KC, Tavares GC, Lima MP, Ortiz JV, Brandão AR, Couceiro KN, et al. Type 1 cardiorenal syndrome in a patient with an acute infection by *Trypanosoma cruzi* in the Brazilian Amazon region – a case report. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018; 51(6): 869-72.
3. Santana RAG, Guerra MGVB, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz JV, Oliveira M, et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2019; 25(1): 132-135.
4. Ortiz JV, Pereira BVM, Couceiro KN, Silva MRHS, Doria SS, Silva PRL, et al. Cardiac evaluation in the acute phase of Chagas' disease with post-treatment evolution in patients attended in the State of Amazonas, Brazil. *Arq Bras Cardiol.* 2019; 112(3): 240-46.