

ANGELICA MARTINS BATISTA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DOENÇA DE CHAGAS EM
PACIENTES SORONEGATIVOS PORTADORES DE MEGAESÔFAGO**

CAMPINAS

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B32d Batista, Angelica Martins
Diagnóstico molecular de doença de Chagas em pacientes soronegativos portadores de megaesôfago / Angelica Martins Batista. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Megaesôfago. I. Costa, Sandra Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : *Molecular diagnosis of Chagas disease in seronegative patients with megaesophagus*

Keywords: • Chagas disease
• Trypanosoma cruzi
• Polymerase chain reaction
• Esophageal motility disorders

Titulação: Mestrado em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Sandra Cecília Botelho Costa
Prof^o. Dr. André Fattori
Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Data da defesa: 07- 08 - 2009

ANGELICA MARTINS BATISTA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DOENÇA DE CHAGAS EM
PACIENTES SORONEGATIVOS PORTADORES DE MEGAESÔFAGO**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, área de concentração em Ciências Básicas.*

ORIENTADORA: PROF^a Dra. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

CAMPINAS

2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Angélica Martins Batista

Orientador: Prof^o. Dr^a. Sandra Cecilia Botelho Costa

Membros:

1. Prof^o. Dr^a. Sandra Cecilia Botelho Costa

Sandra Costa

2. Prof. Dr. André Fattori

André Fattori

3. Prof^o. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Sueli Ogatta

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 07/08/2009

*Aos meus pais,
pelo apoio incondicional em todos os momentos.*

À Dra. Sandra Costa, pela oportunidade e por acreditar neste trabalho.

À Dra. Sueli, pelos ensinamentos que muito contribuíram para a minha formação e pelo exemplo de profissional competente.

Ao Dr. Eros, pelo apoio fundamental, incentivo e pelas sugestões.

Ao Dr. André Fattori, pelas sugestões oportunas.

Ao pessoal do GEDoCh/UNICAMP, em especial à Dra. Maria Elena, Dr. Jamiro e Irene, pelo apoio.

Ao pessoal do laboratório de Patologia Clínica e Dr. Levy, por gentilmente terem cedido espaço para nossas amostras.

Ao pessoal do laboratório: Camila, Carol, Cláudia, Emanuel, Fernanda, Gláucia, Ketti, Michelli, Paula, Renata e Tycha, pelo apoio e pela convivência agradável.

Às amigas Andréia e Natália, pela amizade que resiste ao tempo e à distância e pelas palavras de apoio nos momentos difíceis.

Ao Gustavo, pela paciência, compreensão e presença constante.

“Ostra feliz não faz pérola.”

Rubem Alves

RESUMO	x
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	16
1. Aspectos gerais da doença de Chagas.....	17
2. O agente etiológico	18
3. Transmissão da doença de Chagas	21
3.1. Transmissão vetorial	21
3.2. Transmissão transfusional	23
3.3. Outros mecanismos de transmissão	24
4. A patologia	26
4.1. Fase aguda	26
4.2. Fase crônica	28
4.2.1. Forma crônica cardíaca.....	29
4.2.2. Forma crônica digestiva.....	29
5. Diagnóstico laboratorial.....	31
5.1. Diagnóstico parasitológico	32
5.1.1. Xenodiagnóstico	32
5.1.2. Hemocultura.....	33
5.2. Diagnóstico sorológico.....	33
5.2.1. Sorologia convencional e diagnóstico de megaesôfago chagásico	36
5.3. Diagnóstico molecular.....	37
5.3.1. Alvos diagnósticos.....	38
5.3.1.1. O DNA satélite como alvo potencial	39
5.3.2. Discordância entre sorologia convencional e PCR	41
5.3.3. Perspectivas.....	43
OBJETIVOS	44
CAPÍTULO 1: Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus	46
CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

Tabela 1. Sensibilidade e especificidade obtidas para kits sorológicos disponíveis
no Brasil 35

Figura 1. Esquema geral da forma epimastigota do *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares 19

Figura 2. Formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. A seta indica o cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo 20

Figura 3. Esquema representativo do ciclo da doença de Chagas 22

Figura 4. Classificação radiológica do megaesôfago 30

Figura 5. Fluxograma para a realização de testes laboratoriais para a doença de Chagas na fase crônica 36

Figura 6. Esquema representativo da molécula de minicírculo do kDNA de *T. cruzi* . 39

Figura 7. Diagrama da região repetitiva do DNA satélite de *T. cruzi* de 195 pb organizada *in tandem* 41

RESUMO

A doença de Chagas, cujo agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, completa 100 anos de descoberta. Apesar da implementação de programas visando ao controle da transmissão vetorial, a infecção chagásica segue como um importante problema de saúde pública na América Latina. A globalização da doença de Chagas, consequente à migração de pessoas infectadas para países onde a doença não é endêmica, traz à tona a necessidade de instituição de medidas de controle e vigilância em algumas áreas da Europa e da América do Norte.

A patologia caracteriza-se por uma fase aguda geralmente assintomática com elevada parasitemia e uma fase crônica, em que os parasitos dificilmente são detectados no sangue periférico por métodos parasitológicos convencionais. O curso clínico da infecção por *T. cruzi* é variável, sendo que boa parte dos infectados permanece na forma indeterminada da doença enquanto outros desenvolvem a forma cardíaca, digestiva ou nervosa.

A prevalência do comprometimento do trato digestivo na doença de Chagas varia conforme a área endêmica, podendo alcançar até 14% no Brasil central. A forma digestiva caracteriza-se por lesão dos plexos nervosos intramurais e disfunção motora principalmente do esôfago e do cólon, levando à dilatação progressiva desses órgãos. Em nosso país, a doença de Chagas é o único fator etiológico comprovado para o megaesôfago.

Devido à parasitemia baixa e intermitente, o diagnóstico na fase crônica baseia-se na detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* por metodologias sorológicas convencionais. Apesar de serem considerados métodos sensíveis e que apresentam boa especificidade, há relatos de resultados falso-positivos devido à reação cruzada com outros tripanosomatídeos que circulam na mesma área geográfica de *T. cruzi*. Por outro

lado, existem relatos de imunodiagnóstico inconclusivo ou negativo em pacientes com antecedentes epidemiológicos e manifestações clínicas sugestivas de infecção chagásica. Nestes casos, métodos diagnósticos não convencionais devem ser empregados com o intuito de esclarecer a etiologia da doença.

Neste estudo, determinou-se a soroprevalência para doença de Chagas em uma população com esofagopatia. Dos 518 pacientes com resultados de exames sorológicos convencionais, 409 (79%) apresentaram-se positivos, 31 (6%) inconclusivos e 78 (15%) negativos. A presença de DNA de *T. cruzi* foi avaliada pela N-PCR (nested-PCR) em amostras de sangue de pacientes portadores de megas digestivos com sorologia inconclusiva ou negativa para doença de Chagas. De 41 amostras analisadas, a N-PCR foi positiva em 31 (75,6%) dos casos.

Como todos os pacientes incluídos no estudo apresentavam manifestações clínicas compatíveis com doença de Chagas e a maioria deles nasceu em áreas endêmicas, enfatizamos a importância da busca por métodos diagnósticos mais eficazes. Nossos resultados indicam que a N-PCR é uma ferramenta adequada para detecção de DNA de *T. cruzi* em pacientes soronegativos e pode ser utilizada para determinar a etiologia do megaesôfago.

ABSTRACT

After 100 years of research and despite control programs launched in endemic areas, Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, still remains an important public health problem in Latin America. Immigration of infected persons from endemic to non-endemic areas leads to Chagas disease spread and it increases the need for establishment of control programs and surveillance in North America and some European countries.

Acute phase of Chagas disease is usually free of symptoms and a high parasitemia is observed. Following the acute phase, the chronic stage is characterized by low and intermittent parasitemia. Presentation of chronic chagasic infection is pleomorphic ranging from absence of symptoms to severe cardiac involvement. Symptomatic chronic phase is usually characterized by cardiac or digestive commitment and its current diagnosis relies on the measurement of *T. cruzi*-specific antibodies produced in response to the infection.

Motility disorders and enlargement of digestive organs (commonly esophagus and colon) are consequences of neuronal destruction caused by the persistence of *T. cruzi*. Since idiopathic megaesophagus is a rare condition in Brazil, Chagas disease is considered the main etiology of megaesophagus.

Despite its high sensitivity, conventional serology may present false-positive results due to cross-reactivity to other trypanosomes. On the other hand, false-negative results have been described in patients from endemic areas with suggestive signs of chagasic infection. In order to clarify this controversial situation, alternative methods such as PCR (polymerase chain reaction) have been employed for diagnostic purposes.

In this study, prevalence of Chagas disease in a population with esophageal disorders was assessed by conventional serology. From 518 patients, 409 (79%) presented

positive results, 31 (6%) and 78 (15%) presented inconclusive and negative results, respectively. For the following step, we recruited 41 patients with megaesophagus and negative or inconclusive serology for Chagas disease. *T. cruzi* DNA was detected by N-PCR (nested-PCR) in 31/41 (75.6%) cases.

As all patients included in our study presented suggestive clinical signs of digestive form of Chagas disease and most of them were born in endemic areas, we highlight the importance of diagnosis improvement and its implication in blood banks screening. Our data suggest that N-PCR is an effective tool for detection of *T. cruzi* DNA in patients with inconclusive or negative serology and, eventually, it may be useful to clarify megaesophagus etiology.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Aspectos gerais da doença de Chagas

A história natural da doença de Chagas (Chagas, 1909) iniciou-se há milhões de anos como enzootia de animais selvagens. Com a inserção do homem nos ecótopos naturais, a doença começou a ser transmitida acidentalmente como uma antropozoonose. A devastação florestal observada na América Latina nos últimos séculos propiciou a aproximação entre os vetores da doença e o homem, levando a uma adaptação desses vetores ao ambiente doméstico e peridoméstico (Coura, 2007).

O ciclo silvestre da doença de Chagas é ancestral e os principais reservatórios na natureza são os marsupiais (especialmente os gambás), roedores, tatus, tamanduás, pequenos carnívoros (gatos e cachorros-do-mato), coelhos, macacos e morcegos. O ciclo doméstico, mais recente, está relacionado à inserção humana no ambiente silvestre bem como às condições sócio-econômicas das populações atingidas (Cimerman & Cimerman, 2005).

A doença de Chagas humana é considerada uma endemia negligenciada de alto impacto de morbi-mortalidade na América Latina. A distribuição geográfica da infecção por *T. cruzi* estende-se do México ao sul da Argentina. A Organização Mundial da Saúde estima de 16 a 18 milhões de casos em todo o mundo e cerca de 25% da população latino-americana estão sob risco de adquirir a doença (WHO, 2008). No Brasil, estima-se de 3 a 4 milhões de infectados, sendo que um terço deles apresenta manifestações clínicas (Moncayo, 1999).

Embora o número de casos permaneça elevado e as estimativas de incidência mundial sejam de aproximadamente 50.000 novos casos por ano, os financiamentos para pesquisa, prevenção e controle da doença de Chagas são limitados, além das

opções terapêuticas permanecerem insatisfatórias (Tarleton et al, 2007).

Apesar de ter sido descrita há exatamente um século pelo clínico Carlos Chagas, alguns aspectos ligados à patogênese da doença e a mecanismos intrínsecos da relação parasito-hospedeiro ainda permanecem pouco esclarecidos (Lages-Silva et al, 2001). A busca de novos testes diagnósticos eficientes configura uma etapa importante para o tratamento adequado dos pacientes, mobilizando profissionais da saúde, pesquisadores especializados e instituições internacionais (MSF, 2008).

2. O agente etiológico

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, um eucarioto pertencente à ordem Kinetoplastida, que compreende organismos que apresentam uma região rica em DNA mitocondrial (kDNA). Esta região, denominada cinetoplasto, é única destes organismos (Moreira, Lopez-Garcia & Vickerman, 2004). O material genético do kDNA pode representar até 30% do DNA celular total (De Souza, 1999) e tem sido utilizado na investigação de características moleculares do parasito (Souto et al, 1996; Vago et al, 2000; Manoel-Caetano et al, 2008).

A morfologia de *T. cruzi* baseia-se na observação do parasito fixado em metanol e corado com Giemsa. Pode-se observar a presença do núcleo, do cinetoplasto e do flagelo. Com base na forma geral da célula, na posição relativa entre o núcleo e o cinetoplasto e na saída do flagelo da bolsa flagelar, são definidas as formas evolutivas do tripanosomatídeo: amastigota, epimastigota e tripomastigota.

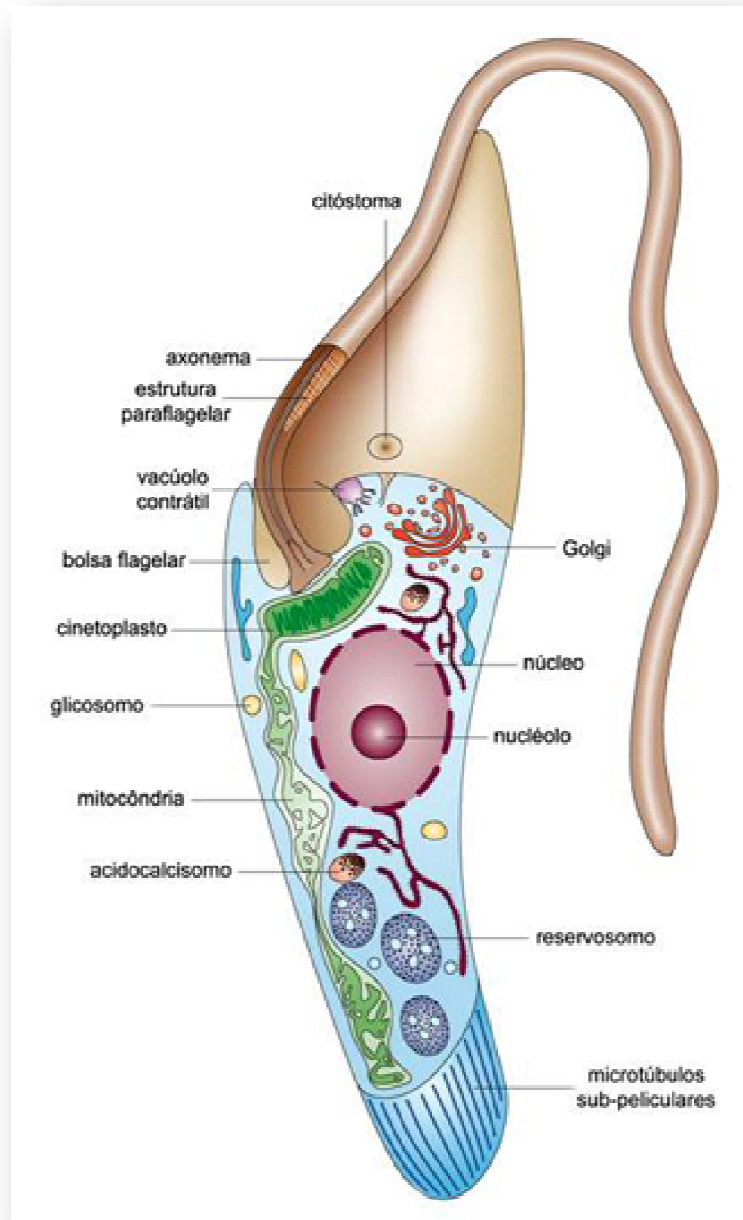


Figura 1: Esquema geral da forma epimastigota do *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares. *Fonte:* FIOCRUZ, 2008.

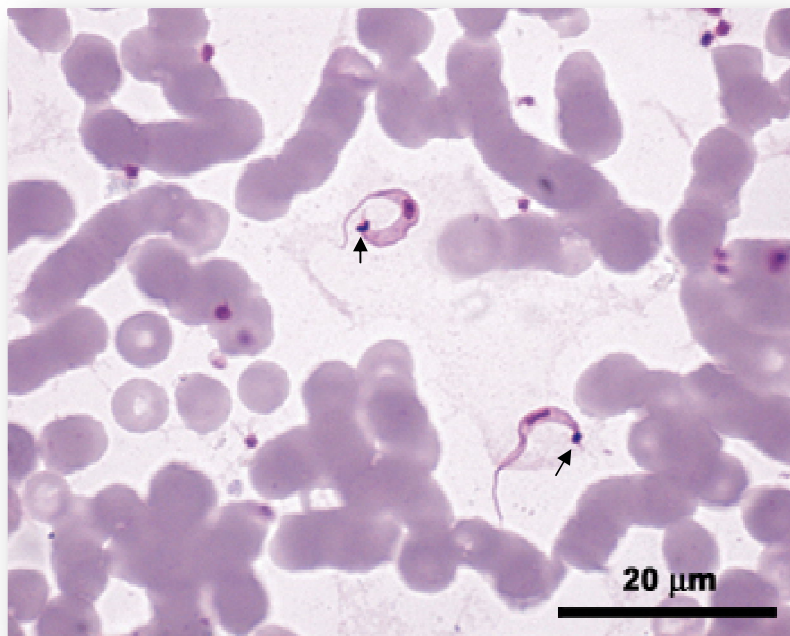


Figura 2: Formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*. A seta indica o cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo. *Fonte:* FIOCRUZ, 2008.

A diversidade genética de *T. cruzi* vem sendo observada já há algum tempo por diferentes abordagens buscando marcadores enzimáticos, polimorfismos, cariótipos moleculares, *fingerprints* de DNA, entre outros (Morel et al, 1980; Miles et al, 1980; Macedo et al, 1992). Tais pesquisas têm sido realizadas na tentativa de correlacionar as diferentes cepas a suas propriedades biológicas distintas, bem como às características clínicas e epidemiológicas da infecção (Moncayo & Yanine, 2006).

Estudos iniciados por Miles et al (1977), com parasitos isolados de diferentes hospedeiros em várias regiões do Brasil, estabeleceram três grupos distintos com base

no perfil eletroforético de isoenzimas ou MLEE (multi-locus enzyme electrophoresis). Estes grupos foram designados zimodemas (Z1, Z2 e Z3). Estudos epidemiológicos demonstraram associação de Z1 e Z3 com o ciclo silvestre e Z2 com o ciclo doméstico (Miles et al 1980).

Estudos posteriores sugeriram a existência de duas linhagens filogenéticas principais de *T. cruzi* (grupos I e II). No Brasil, o grupo I está relacionado, geralmente, ao ciclo silvestre do *T. cruzi* e à infecção de marsupiais, enquanto o grupo II está associado ao ciclo peridoméstico (Fernandes et al, 1998).

3. Transmissão da doença de Chagas

3.1. Transmissão vetorial

A transmissão natural da doença ocorre por meio vetorial. Os vetores são insetos triatomíneos hematófagos da família Reduviidae, popularmente conhecidos como “barbeiros” ou “chupanças”. O ciclo biológico de *T. cruzi* no homem inicia-se após o repasto sanguíneo do inseto como ilustrado na Figura 3. Após a picada, o triatomíneo infectado defeca próximo ao local e, ao coçar a região irritada, o indivíduo leva formas tripomastigotas metacíclicas, contidas nas fezes do vetor, para o interior da pele. A partir daí, ocorre invasão de células adjacentes ao local da picada e, após o parasito escapar para o citosol da célula hospedeira, as formas tripomastigotas metacíclicas diferenciam-se em formas amastigotas. A partir deste momento, ocorrem sucessivas divisões, tornando a célula repleta de parasitos. Após nova diferenciação de amastigotas em tripomastigotas, as formas flageladas são liberadas na corrente sanguínea, podendo a

partir daí, serem seguidos dois caminhos: (1) formas tripomastigotas invadem novas células (SMF, células musculares: lisa, esqueléticas, cardíacas, nervosas, etc.), reiniciando o ciclo no hospedeiro ou (2) formas tripomastigotas podem ser ingeridas novamente por um triatomíneo, onde se diferenciarão em epimastigotas, e posteriormente em tripomastigotas metacíclicos com capacidade infectiva (De Souza, 1984).

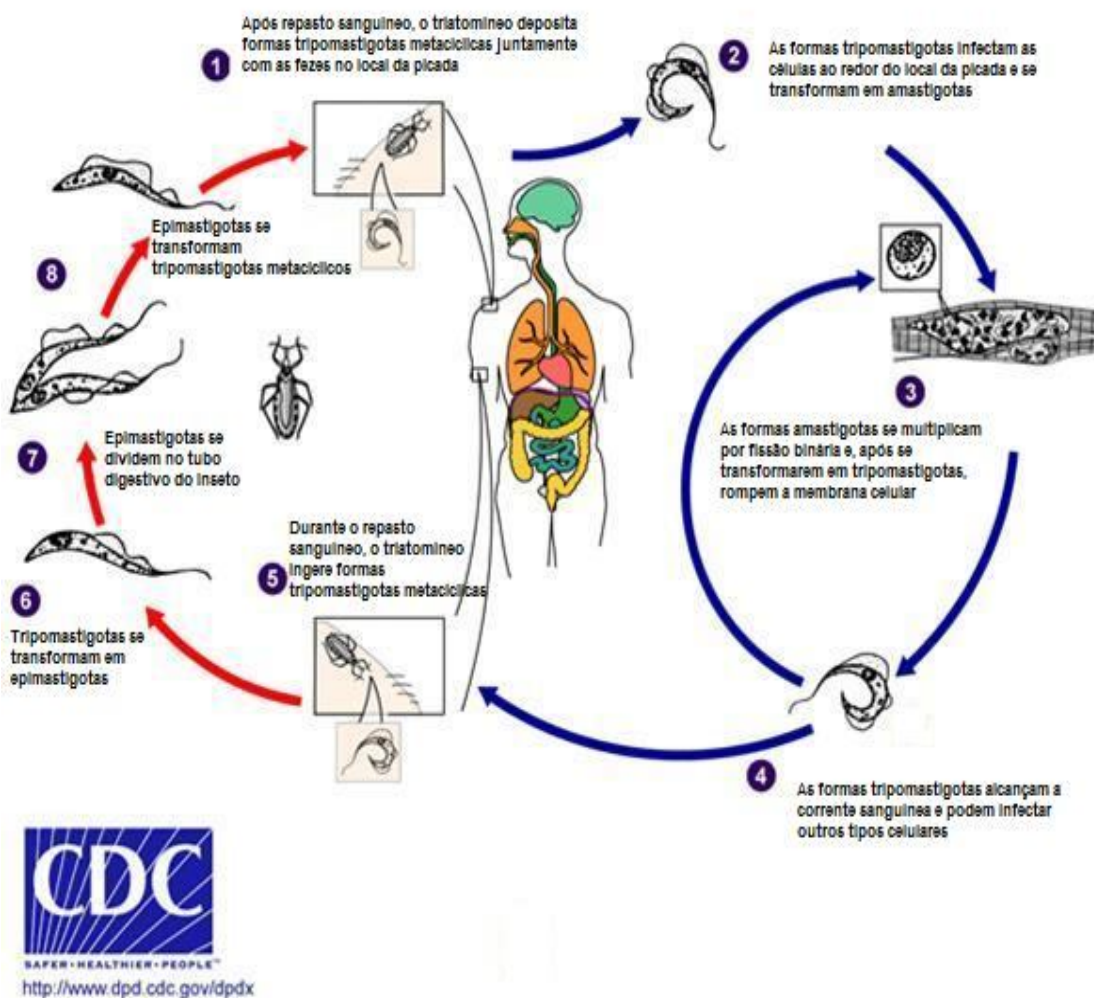


Figura 3: Esquema representativo do ciclo da doença de Chagas.

As diferentes espécies de triatomíneos conhecidas apresentam capacidades de transmissão distintas. Além disso, existem variações relacionadas à virulência da cepa do *T. cruzi*. Tais fatores associados à própria diversidade genética do hospedeiro resultam em uma alta complexidade da patogênese da doença de Chagas.

Em junho de 2006, o Brasil recebeu o certificado de interrupção de transmissão vetorial por *Triatoma infestans*, até então o principal vetor da doença em nosso país. A erradicação dos principais vetores é um dos objetivos principais da Iniciativa do Cone Sul, programa intergovernamental iniciado em 1991 reunindo seis países da América Latina. Atualmente três desses países (Uruguai, Chile e Brasil) são considerados livres de transmissão vetorial por *T. infestans* (WHO, 2008).

Apesar do controle da transmissão por *T. infestans* no Brasil, a doença de Chagas pode ser considerada emergente em algumas regiões consideradas livres da doença como a região da Bacia Amazônica, onde vetores silvestres são os principais agentes transmissores e microepidemias locais são observadas (WHO, 2008).

3.2. Transmissão transfusional

Apesar do controle da transmissão vetorial em nosso país, ainda existem outras formas de se adquirir doença de Chagas. O segundo mecanismo mais frequente (5 a 20%) é a via transfusional (Schmunis, 2000). Os mecanismos e estratégias de controle para evitar a transmissão transfusional foram desenvolvidos na década de 50 e implementados na década de 60. Mas somente nos anos 80 os programas de controle em bancos de sangue foram totalmente instituídos nos países endêmicos (Wendel, 1997; Dias & Schofield, 1998). O controle da transmissão transfusional envolve

essencialmente a triagem sorológica dos doadores de sangue (WHO, 1991; Wendel, 1997) e a melhoria da qualidade dos testes empregados quanto à sensibilidade e especificidade (Wanderley et al, 1993; Sáez-Alquézar et al, 1998; Umezawa et al, 2004). O risco de ocorrer infecção em um indivíduo, por uma única transfusão de um doador com sangue infectado, varia conforme a gravidade da doença no doador, podendo chegar a 25% (Moncayo & Yanine, 2006). Entretanto, indivíduos que recebem múltiplas transfusões, como hemofílicos, pacientes com outras doenças hematológicas ou aqueles que realizam diálise, possuem uma chance 8,7 vezes maior de contaminação por *T. cruzi* (Schmunis, 1999).

Inicialmente, a transmissão transfusional assumiu uma grande importância epidemiológica devido ao movimento migratório de pessoas infectadas das zonas rurais endêmicas para as zonas urbanas, o que ocasionou aumento de indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* entre doadores de sangue no Brasil. Entretanto, o controle da transmissão vetorial levou a uma progressiva diminuição de doadores de sangue e de gestantes infectados, reduzindo os riscos de transmissão transfusional e congênita (Dias & Coura, 1997; Schofield & Dias, 1999).

3.3. Outros mecanismos de transmissão

O terceiro mecanismo mais freqüente é a transmissão vertical (via congênita ou transplacentária) com prevalência estimada em 0,5 a 8% (Schmunis, 2000), sendo que a probabilidade de ocorrência de doença em crianças de mães chagásicas varia de menos de 1 até 10% (Prata, 2001).

As formas de transmissão transfusional e congênita não se limitam às regiões endêmicas da doença de Chagas. Ultimamente, com a facilidade de migração de pessoas, muitos casos vêm sendo relatados em países considerados não endêmicos e que recebem grande contingente de imigrantes latinos. Recentemente, um estudo realizado em Barcelona revelou prevalência de 41% entre 489 pacientes latino-americanos, a maioria originária da Bolívia (Muñoz et al, 2009). Na França, Lescure et al (2008) relataram o diagnóstico de 9 casos da doença entre 2004 e 2006. Na Suíça foram relatados dois casos de transmissão congênita e um estudo retrospectivo detectou prevalência de 9,7% entre 72 gestantes latino-americanas (Jackson et al, 2009). Nos Estados Unidos, os casos importados de doença de Chagas não são mais excepcionais, o que levou à implementação de estratégias de controle em bancos de sangue (CDC, 2007).

De fato, a migração internacional mudou o padrão epidemiológico da doença de Chagas, tornando-a um problema de saúde pública emergente em países da América do Norte e da Europa. A globalização da doença obriga estes países a estabelecerem medidas de prevenção e controle, principalmente na triagem de doadores em bancos de sangue, assim como o eventual seguimento e tratamento dos pacientes infectados (PAHO, 2005).

Outros mecanismos secundários de transmissão da doença de Chagas são os transplantes de órgãos e acidentes de laboratório. Um mecanismo de pequena importância epidemiológica, mas que pode se transformar em problema de saúde pública se não detectado ou se não tomadas precauções necessárias, é a transmissão da doença por via oral, com ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi* (Coura & Dias, 2009).

Esta forma de transmissão ganhou destaque em 2005, devido ao surto em Santa Catarina quando foram identificados 45 casos suspeitos de doença de Chagas aguda relacionados à ingestão de caldo de cana, sendo que cinco pacientes foram a óbito. Entre 2005 e 2007 o Ministério da Saúde/SVS recebeu a notificação de 22 surtos de doença aguda em vários estados. Na maioria dos eventos, pôde-se comprovar a associação da ocorrência de casos com o consumo de alimentos *in natura*, como caldo de cana (Santa Catarina - 2005 e Bahia - 2006), bacaba (Maranhão, Pará - 2006) e açaí (Pará - 2006 e 2007, Amazonas - 2007).

4. A patologia

Os determinantes da doença de Chagas resultam basicamente da quantidade de formas infectivas no inóculo inicial, da diversidade genética da cepa de *T. cruzi* e da resposta imune do hospedeiro (Coura, 2007). A interação desses fatores justifica o pleomorfismo da patologia.

Classicamente, a doença de Chagas é dividida em duas fases: a fase aguda, que tem início logo após a infecção por *T. cruzi* e a fase crônica, que pode permanecer assintomática por muitos anos (forma indeterminada) ou evoluir para as manifestações clínicas da doença (forma determinada) (Moncayo & Yanine, 2006).

4.1. Fase aguda

A fase aguda caracteriza-se por alta parasitemia e geralmente se apresenta assintomática ou oligossintomática, sendo reconhecida apenas em cerca de 1 a 2% dos

casos com tendência a ser mais grave em crianças (Ribeiro & Rocha, 1998). Alguns indivíduos podem apresentar febre e mialgia durante algumas semanas. Na ausência de tratamento adequado, cerca de 5 a 10% dos pacientes agudos sintomáticos vão a óbito devido ao desenvolvimento de encefalomielite ou insuficiência cardíaca grave e, em casos raros, morte súbita (Prata, 2001).

Uma reação inflamatória local conhecida como chagoma pode se desenvolver na porta de entrada do parasito. Quando a porta de entrada é a conjuntiva ocular, pode ser observado um edema periorbital conhecido como sinal de Romaña. Transmissão por via congênita ou oral, bem como através de transplante de órgãos e acidentes de laboratório também podem levar a casos agudos da doença (Moser et al, 1989).

O tratamento na fase aguda é particularmente eficaz com taxas de cura de 60 a 90% baseadas na negatificação de provas sorológicas e parasitológicas. A terapêutica específica é recomendada em todos os casos de fase aguda, independente do mecanismo de transmissão (FUNASA, 1997), o que inclui a via congênita, transfusional e acidental.

No Brasil, o único composto disponível para tratamento etiológico da doença de Chagas é o benzonidazol (Rochagan®). Como o fármaco atua contra formas tripomastigotas sanguíneas, seu efeito é satisfatório na fase aguda uma vez que há muitos parasitos circulantes. Os efeitos de toxicidade relacionados ao medicamento são menos frequentes na fase aguda tanto em crianças quanto em adultos (Rassi, Rassi Jr & Gabriel Rassi, 2000).

4.2. Fase crônica

De dois a quatro meses após a infecção inicial, a doença entra em período de latência clínica, tornando-se crônica (Prata, 1990). A evolução da fase aguda para a fase crônica é acompanhada pela diminuição da parasitemia e elevação de anticorpos específicos da classe IgG. Grande parte dos infectados evolui para uma fase crônica assintomática, caracterizada pela presença da infecção, comprovada através de reações sorológicas específicas, mas livre de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas (Moncayo & Yanine, 2006). Estima-se que pelo menos 50% da população infectada apresentem a forma indeterminada da doença de Chagas (Ribeiro & Rocha, 1998). Apesar de assintomáticos, têm sido registrados casos de morte súbita em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas (Neves, 2005).

A doença crônica pode se tornar clinicamente evidente anos ou décadas após a infecção inicial. Apenas 10 a 30% desses pacientes crônicos apresentam sintomas, sobretudo manifestações cardíacas e digestivas (Vaidian et al, 2004).

De acordo com o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (2005) o tratamento específico na fase crônica é recomendado principalmente em crianças. Embora faltem evidências de sucesso terapêutico, ele pode ser instituído na fase crônica recente em adultos (10 a 12 anos após a infecção inicial). Na fase crônica de maior duração, a presença das formas indeterminada, cardíaca leve e digestiva é indicação para tratamento etiológico. O objetivo, nestes casos, é diminuir a parasitemia e prevenir ou reduzir os sintomas da doença (WHO, 2002).

4.2.1. Forma crônica cardíaca

É a forma mais prevalente da doença de Chagas. Em indivíduos com comprometimento cardíaco, podem ser observadas alterações do ritmo cardíaco, fenômenos tromboembólicos e insuficiência cardíaca congestiva. Histologicamente, a forma cardíaca caracteriza-se por miocardite crônica intensa, fibrosante, com grande hipertrofia de cardiomiócitos. Cerca de 20 a 40% dos pacientes no Centro-Oeste e Sudeste do Brasil apresentam a forma cardíaca da doença de Chagas (Neves, 2005).

4.2.2. Forma crônica digestiva

Embora as manifestações cardíacas sejam comuns a todas as áreas geográficas onde a doença existe, a forma digestiva praticamente não ocorre em chagásicos que vivem nos países americanos situados acima da linha do Equador. Entretanto, ela é endêmica no Brasil Central, em áreas dos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Bahia, além de presente no Chile, Argentina e Uruguai. Estudos iniciados na década de 1950 (Köberle & Nador, 1955) levaram a uma melhor compreensão da relação entre doença de Chagas e megas digestivos observados em áreas endêmicas. A manifestação mais freqüente é o megaesôfago, seguido por megacólon (Malta, 1996).

A forma digestiva da doença de Chagas caracteriza-se por lesão dos plexos nervosos intramurais em decorrência do parasitismo das camadas musculares dos órgãos afetados, o que interfere na função motora principalmente do esôfago e do cólon, fazendo com que a musculatura desses órgãos responda com contrações desordenadas (Sanchez-Lermen et al, 2007).

No Brasil, a doença de Chagas é a causa mais importante de megaesôfago. Diversos estudos sugerem a esofagopatia como um bom marcador da infecção chagásica no Brasil (Kamiji & de Oliveira, 2005; Peñaranda-Carrillo et al, 2006; Sanchez-Lermen et al, 2007). O comprometimento do esôfago é avaliado no estudo radiológico, através do qual é possível distinguir os estágios da doença (Crema et al, 2003). Seguindo o padrão de alterações morfológicas e motoras, o megaesôfago chagásico é classificado em graus de I a IV (Rezende et al, 1960) conforme ilustrado na Figura 4. O estadiamento corresponde ao progressivo aumento de calibre do órgão.

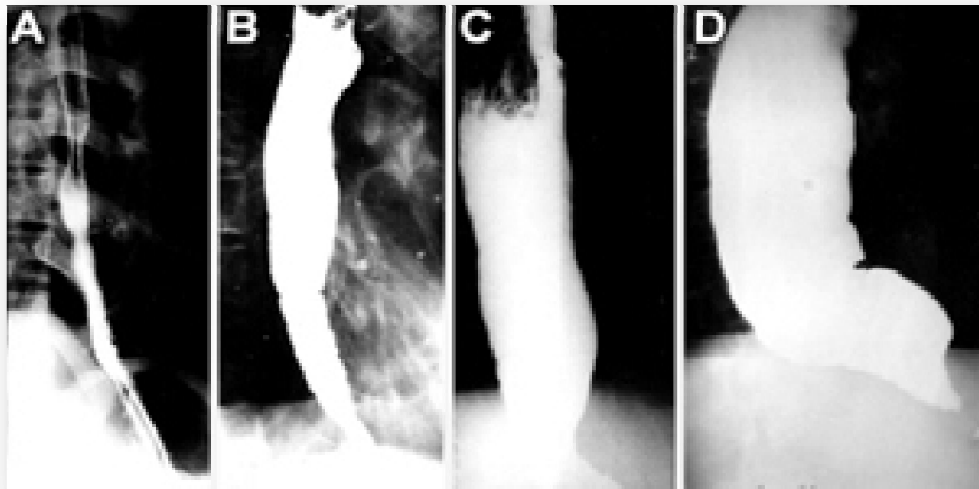


Figura 4: Classificação radiológica do megaesôfago. A: grau I (megaesôfago com calibre preservado); B: grau II; C: grau III; D: grau IV (megaesôfago avançado, com calibre bastante aumentado).

O megaesôfago, juntamente com o aparecimento de sintomas típicos como disfagia, regurgitação e emagrecimento, podem ocorrer após vários anos do diagnóstico sorológico e/ou do estabelecimento da lesão neuromotora. Entretanto, a presença de

outros sintomas relacionados à lesão esofágica também comuns a outras doenças dificulta a interpretação etiológica como sendo decorrente da infecção por *T. cruzi* (Sanchez-Lermen et al, 2007).

O megacólon chagásico é relativamente frequente em nosso país. Dados divulgados em 2002 pela Organização Mundial da Saúde sugerem que cerca de 10 a 12% dos pacientes chagásicos crônicos desenvolvem megacólon. O quadro clínico da doença de Chagas afetando o intestino grosso caracteriza-se pelo aparecimento de constipação intestinal, que, geralmente, tem evolução lenta e progressiva (Santos Júnior, 2002). Em alguns casos pode ocorrer associação de comprometimento esofágico e do cólon em um mesmo paciente, caracterizando a forma digestiva mista da doença de Chagas. A presença de cardiopatia chagásica crônica também deve ser pesquisada nestes pacientes. Na evolução da doença de Chagas, a esofagopatia geralmente precede a cardiopatia (Rezende, 1958).

A escolha do tipo de tratamento dos megas digestivos depende de uma série de fatores como o grau de comprometimento do órgão, a idade e a condição clínica do paciente, sendo essencial definir a etiologia do megaesôfago e/ou megacólon para avaliação prognóstica e terapêutica.

5. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi* baseia-se em métodos parasitológicos e sorológicos, sendo orientado em função da fase clínica da infecção (Ferreira et al, 1996). Os métodos parasitológicos (diretos ou indiretos) têm como

objetivo a busca do parasito enquanto os sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro dos indivíduos infectados.

5.1. Diagnóstico parasitológico

Os métodos parasitológicos podem ser diretos ou indiretos e são mais empregados na fase aguda da doença, uma vez que esta se caracteriza por alta parasitemia. Os métodos diretos incluem a pesquisa de parasitos por exame de sangue a fresco, gota espessa e esfregaço sanguíneo. O teste direto a fresco é mais sensível que o esfregaço corado por Giemsa e deve ser o método de escolha para diagnóstico etiológico na fase aguda. Caso sejam obtidos resultados negativos, devem ser usados métodos de concentração. Os testes de concentração (microhematócrito ou Strout) apresentam de 80 a 90% de positividade e são recomendados no caso de forte suspeita de doença de Chagas aguda e negatividade do exame de sangue a fresco. Em casos sintomáticos por mais de 30 dias, devem ser os testes de escolha, uma vez que a parasitemia começa a declinar (Consenso do Ministério da Saúde, 2005).

5.1.1. Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico é um método parasitológico indireto introduzido por Brumpt (1914), com sensibilidade de 85 a 100% em pacientes na fase aguda da doença de Chagas e menor que 50% na fase crônica. Sua grande desvantagem é o desconforto na realização do exame e a demora para a obtenção dos resultados, que pode chegar até 90 dias (Rey, 1991; Ferreira & Ávila, 1995). A associação da hemocultura ao

xenodiagnóstico é procedimento padrão principalmente quando as provas sorológicas são inconclusivas, em pacientes imunossuprimidos e no controle pós-terapêutico. Se empregados repetidas vezes, a sensibilidade das técnicas aumenta. O emprego rotineiro do xenodiagnóstico na fase crônica fica restrito principalmente devido à sensibilidade baixa, apresentando frequentemente resultados falso-negativos (Andersson, 2004).

5.1.2. Hemocultura

O cultivo de sangue ou hemocultura baseia-se na capacidade de *T. cruzi* crescer e se multiplicar em diferentes meios acelulares que contenham hemina ou derivados da hemoglobina. A técnica requer condições assépticas para a coleta e para o manuseio da amostra de sangue, o que a torna pouco prática nos trabalhos de campo. O protocolo desenvolvido por Chiari et al (1989) vem sendo modificado a fim de aumentar a sensibilidade do método (Luz, 1999).

5.2. Diagnóstico sorológico

Na fase crônica da doença, o diagnóstico parasitológico direto torna-se comprometido em virtude da parasitemia baixa e intermitente. Entretanto, apesar do reduzido número de parasitos circulantes, títulos elevados de anticorpos específicos contra antígenos de *T. cruzi* podem ser detectados. Portanto, na fase crônica, o diagnóstico é essencialmente sorológico, baseando-se na pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro. A detecção desses anticorpos anti-*T. cruzi* pode ser realizada por técnicas de sorologia convencional como hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência

indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Dentre as metodologias não convencionais, estão a lise mediada pelo complemento (CoML), reação de Western blot, ELISA com antígenos recombinantes e reação de imunofluorescência por citometria de fluxo.

De forma geral, os métodos convencionais são bastante sensíveis, de fácil execução, apresentam baixo custo e fornecem resultados mais rápidos do que os métodos sorológicos não convencionais e os exames parasitológicos. No entanto, seu desempenho pode variar em função dos reagentes utilizados, dos procedimentos técnicos e dos critérios de interpretação de resultados.

A utilização de apenas um teste apresenta sensibilidade e especificidade em torno de 98,91 e 98,52%, respectivamente. A associação de dois ou três métodos aumenta a sensibilidade para cerca de 100% (Ferreira et al, 2001). Resultados falso-positivos ocorrem geralmente devido a reações cruzadas com outros tripanosomatídeos como *Leishmania* sp (Araújo, 1986; Chiler, Samudio & Zouler, 1990; Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003).

Um estudo recente (Otani et al, 2009) avaliou o desempenho de diferentes kits sorológicos disponíveis comercialmente para um total de 437 amostras oriundas de 10 países. Os índices de sensibilidade e especificidade de pelo menos quatro dos kits baseados em ensaios imunoenzimáticos foram suficientes para justificar o seu uso único na triagem em bancos de sangue. A avaliação dos testes disponíveis no Brasil está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Sensibilidade e especificidade obtidas para kits sorológicos disponíveis no Brasil.

Ensaio	Sensibilidade	Especificidade	Fabricante
HBK 401 Hemobio Chagas	100	99,62	Embrabio
Chagas ELISA	97,62	97,71	Ebram
Bioelisacruzi	98,21	99,24	Biolab-Mérieux
Teste Chagas-HAI	88,09	59,92	Ebram
Imuno-HAI Chagas	100	95,80	WAMA
Chagas Hemagen HÁ			
Hemacruzi	99,40	97,33	Biolab-Mérieux
WB	100	97,3	bioMérieux
IF	98,2	98	bioMérieux

Fonte: Modificado de Otani et al, 2009.

Segundo o Consenso do Ministério da Saúde (2005), o diagnóstico etiológico na fase crônica deve ser realizado utilizando-se dois testes de princípios metodológicos diferentes: um teste de elevada sensibilidade (ELISA com antígeno total ou frações semi-purificadas do parasito ou IFI) e outro de alta especificidade (ELISA, utilizando antígenos recombinantes específicos de *T. cruzi*), conforme descrito no fluxograma apresentado na Figura 5.

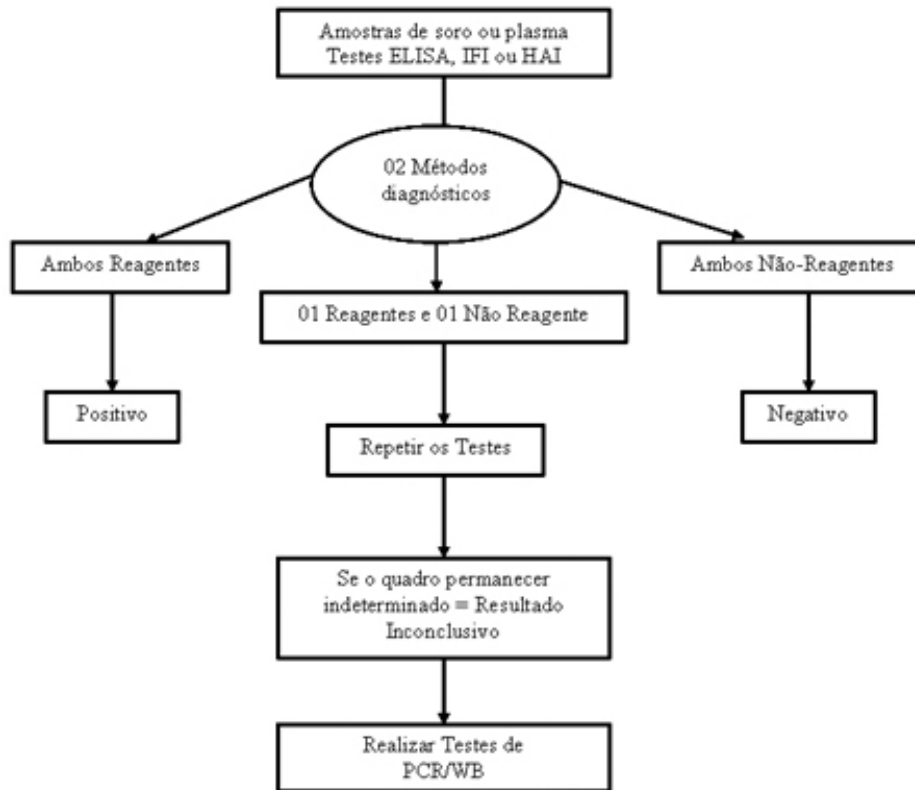


Figura 5: Fluxograma para a realização de testes laboratoriais para a doença de Chagas na fase crônica. WB, Western Blot. *Fonte:* Ministério da Saúde, 2005.

5.2.1. Sorologia convencional e diagnóstico de megaesôfago chagásico

Quando se realiza exame sorológico para doença de Chagas em portadores de megaesôfago em zona endêmica, obtém-se um índice de positividade aproximado de 90% (Rezende & Moreira, 2000). Entretanto, há casos com antecedentes epidemiológicos e manifestações clínicas sugestivas de doença de Chagas que apresentam reações sorológicas repetidamente negativas, conforme relatado por Luquetti (1987). A análise de 240 soros de pacientes com megaesôfago por HAI e

hemaglutinação direta revelou 89,2% de resultados positivos. Dos 26 resultados negativos, 24 tinham epidemiologia positiva para doença de Chagas e em 2 deles houve confirmação parasitológica. A ocorrência de xenodiagnóstico positivo em casos com sorologia negativa sugere a possibilidade de inexistência de anticorpos específicos circulantes (Brénière et al, 1984; Brénière et al, 1989).

5.3. Diagnóstico molecular

As limitações inerentes aos testes laboratoriais de rotina, especialmente em se tratando do diagnóstico na fase crônica, explicam o interesse e a necessidade de implantação de um método direto e mais sensível que permita monitorar a presença do parasito e confirmar a etiologia da doença. Com o avanço da biologia molecular, novas técnicas têm sido descritas para auxiliar no diagnóstico das doenças infecto-parasitárias. Dentre estas técnicas, destaca-se a PCR (reação em cadeia da polimerase) (Saiki et al, 1988), baseada no emprego de oligonucleotídeos sintéticos que amplificam sequências gênicas específicas do patógeno-alvo.

A PCR apresenta boa sensibilidade, o que permite a detecção de quantidades mínimas de DNA de *T. cruzi*, facilitando o diagnóstico de pacientes crônicos que apresentam baixo número de parasitos na corrente sanguínea (Añez et al, 1999). A metodologia tem sido utilizada como alternativa no diagnóstico da doença de Chagas; em alguns casos, a sensibilidade chega a 100% quando comparada a métodos sorológicos (Ávila et al, 1993). Entretanto, existem fatores como diferenças regionais, gravidade das formas clínicas e diferença genética dos isolados que podem contribuir para a variabilidade de resultados. O procedimento emprega reagentes e aparelhagem

dispendiosa e também exige treinamento especializado e cuidados para evitar contaminação.

A PCR pode ser empregada em bancos de sangue quando a sorologia é inconclusiva. Além disso, é um método alternativo no controle pós-terapêutico pela maior sensibilidade frente às provas parasitológicas indiretas (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003). A detecção de *T. cruzi* pela PCR em transplantados é um procedimento mais sensível e específico para diagnosticar a reativação da doença de Chagas (Maldonado et al, 2004).

5.3.1. Alvos diagnósticos

A PCR tem sido aplicada para amplificação do kDNA de *T. cruzi* fazendo uso de oligonucleotídeos cujas sequências estão localizadas em regiões conservadas dos minicírculos (Figura 6). A amplificação parece ser espécie-específica e independente da cepa do parasito (Sturm et al, 1989). Muitos estudos clínicos utilizando a PCR para essa região mostram elevada sensibilidade e especificidade (Ávila et al, 1993; Britto et al, 1993; Wincker et al, 1994; Vago et al, 1996; Chiari, 1999; Gomes et al, 1999). Entretanto, outros trabalhos reportam baixa sensibilidade do método (Britto et al, 1995; Junqueira et al, 1996).

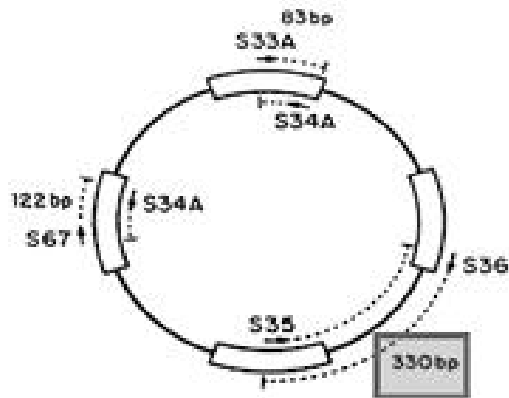


Figura 6: Esquema representativo da molécula de minicírculo do kDNA de *T. cruzi*. Assinaladas as regiões de sequências conservadas (retângulos), as posições dos iniciadores da PCR (setas) e os respectivos produtos amplificados (pontilhado). *Fonte:* adaptado de Sturm et al, 1989.

Vera-Cruz et al (2003) utilizaram o método de N-PCR para amplificação da proteína flagelar Tc-24 específica de *T. cruzi*. A princípio, este método mostrou-se uma boa alternativa para acompanhamento da persistência do parasito (Andersson, 2004).

5.3.1.1. O DNA satélite como alvo potencial

A partir do sequenciamento gênico da cepa CL-Brener de *T. cruzi* realizado por El-Sayed et al (2005), estima-se que mais de 50% do genoma do parasito está associado com elementos repetitivos, tais como transposons e genes multi-cópias. Estas sequências repetitivas parecem ter papel importante na estrutura genômica e na expressão gênica do *T. cruzi*. Um elemento repetitivo do DNA satélite de 195 pb com

120.000 cópias por genoma foi a primeira sequência nuclear repetitiva descrita em *T. cruzi* (Gonzales et al, 1984).

Por constituir cerca de 9% do DNA nuclear total e não apresentar homologia com sequências de outros tripanosomatídeos que circulam na mesma área geográfica do *T. cruzi*, a família de sequências repetitivas de 195 pb constitui um alvo adequado para o diagnóstico da doença de Chagas. Utilizando os oligonucleotídeos TCZ1 e TCZ2, Moser et al (1989), empregaram a PCR para detecção de DNA satélite de *T. cruzi* em amostras de sangue de pacientes chagásicos. Baseados neste estudo, outros grupos aprimoraram o mesmo protocolo para detecção de material genético do parasito em amostras de soro (Russomando et al, 1992), de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos (Virreira et al, 2003) e de tecido cardíaco (Olivares-Villagómez et al, 1998).

Trabalhos posteriores utilizaram a PCR para detecção do DNA satélite de *T. cruzi* no monitoramento do tratamento etiológico para doença de Chagas em recém-nascidos. Os resultados obtidos confirmam a eficácia da técnica no controle de cura (Shikanai-Yasuda et al, 1996; Russomando et al, 1998).

A partir da padronização da técnica de N-PCR para amplificação de um fragmento de 149 pb (Figura 7), Marcon et al (2002) relataram uma boa especificidade na detecção de DNA satélite de *T. cruzi* em sangue de pacientes chagásicos crônicos. De 30 casos com sorologia inconclusiva para doença de Chagas, a N-PCR esclareceu 13. A sensibilidade da técnica foi de 82%.

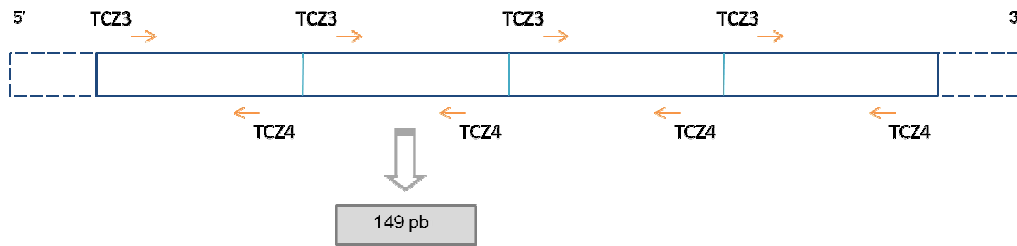


Figura 7: Diagrama da região repetitiva do DNA satélite de *T. cruzi* de 195 pb organizada *in tandem*. As setas indicam as posições dos oligonucleotídeos da N-PCR (Marcon et al, 2002). O produto amplificado é de 149 pb.

5.3.1. Discordância entre sorologia convencional e PCR

O diagnóstico etiológico da doença de Chagas ainda representa um desafio para clínicos e cientistas. Além dos resultados sorológicos falso-positivos, são encontrados relatos de resultados falso-negativos com PCR positiva. Em 1993, estudando uma população de uma área altamente endêmica em MG, Ávila et al encontraram resultados de PCR positiva em 3 pacientes soronegativos. Estudo realizado por Wincker et al (1994) mostrou 2 resultados de PCR positiva em amostras de sangue de crianças soronegativas, sendo que em uma delas também houve observação direta do parasito no sangue.

Utilizando o kDNA como alvo diagnóstico, Gomes et al (1999) relataram PCR positiva em 10 de 21 pacientes soronegativos assintomáticos nascidos em área endêmica. Empregando um método sorológico não convencional baseado na detecção de anticorpos líticos (CoML), 8 desses pacientes apresentaram resultados sorológicos negativos.

Ao pesquisar 9 amostras de sangue de pacientes soronegativos também oriundos de área endêmica, Castro et al (2002) encontraram 3 casos de PCR positiva. A infecção chagásica foi também confirmada por hemocultura em um destes 3 casos. Por fim, utilizando como alvo uma sequência repetitiva de DNA satélite de *T. cruzi*, Salomone et al (2003) relataram 12 resultados de PCR positiva entre 80 pacientes argentinos soronegativos.

Na tentativa de explicar a discordância entre resultados sorológicos e da PCR, os autores tendem a descartar a hipótese de contaminação do DNA da amostra durante a reação de PCR uma vez que são utilizados controles negativos e os procedimentos são realizados cuidadosamente de forma a minimizar a possibilidade de contaminação. A hipótese mais aceita para esta situação controversa baseia-se na variação de reações imunológicas do hospedeiro quando em contato com o parasito (Gomes et al, 1999; Castro et al, 2002; Salomone et al, 2003).

Pacientes infectados produzem anticorpos contra muitos antígenos do *T. cruzi* e esses exibem grandes diferenças quali e quantitativas (Mendes et al, 1997). Segundo Brénière (1984), 2,6% dos pacientes chagásicos crônicos incluídos em seu estudo apresentaram importante imunossupressão de anticorpos específicos contra o parasito, resultando em imunodiagnóstico negativo para a doença, mesmo com a confirmação da infecção pelo *T. cruzi* através do xenodiagnóstico (Brénière et al, 1988).

Deste modo, supõe-se que algumas cepas do *T. cruzi* não induzam a resposta humoral no homem. Em não havendo o reconhecimento de anticorpos anti-*T. cruzi*, têm-se resultados falso-negativos. Sendo assim, a etiologia chagásica não deve ser afastada, mesmo na ausência de confirmação por provas sorológicas, se existirem

antecedentes epidemiológicos e indicadores clínicos da doença de Chagas (Luquetti, 1987).

5.3.2. Perspectivas

Atualmente, a PCR pode ser considerada como técnica padrão-ouro para a detecção de DNA de parasitos circulantes na doença de Chagas. Entretanto, existe a necessidade de se estabelecer um protocolo consenso. Essa preocupação decorre da extrema variabilidade nos níveis de sensibilidade gerada pelos diferentes protocolos já descritos. Os resultados dependem das características epidemiológicas das populações estudadas, do volume de sangue coletado, do método utilizado para extração de DNA, da sequência alvo e oligonucleotídeos, dos reagentes e das condições de PCR (Britto, 2009).

A metodologia para detecção de material genético de *T. cruzi* vem sendo aperfeiçoada com o desenvolvimento de sistemas de PCR em tempo-real (Piron et al, 2007; Duffy et al, 2009). A implementação de um ensaio capaz de quantificar a carga parasitária de pacientes chagásicos e monitorar a parasitemia em resposta ao tratamento etiológico será particularmente útil como um indicador da eficácia terapêutica (Britto, 2009). Além disso, poderá esclarecer os casos de pacientes que apresentam manifestações clínicas sugestivas de doença de Chagas, mas têm sorologia inconclusiva ou negativa.

OBJETIVOS

- Determinar a soroprevalência para doença de Chagas em portadores de esofagopatia;
- Identificar pacientes portadores de megaesôfago com sorologia inconclusiva ou negativa para doença de Chagas;
- Detecção do DNA satélite de *T. cruzi* empregando N-PCR em amostras de sangue de portadores de megaesôfago com sorologia inconclusiva ou negativa para doença de Chagas;
- Correlacionar os resultados de sorologia convencional com os resultados da N-PCR.

**CAPÍTULO 1: Evidence of chagasic infection in seronegative
Brazilian patients with megaesophagus**

**Evidence of Chagas Disease in Seronegative Brazilian Patients with
Megaesophagus**

Angelica M. Batista, Camila Aguiar, Eros A. Almeida, Maria E. Guariento, Jamiro S.
Wanderley, Sandra C. B. Costa

Authors' affiliation: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, São Paulo,
Brazil

Address for correspondence: Sandra Cecília Botelho Costa, Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, PO Box 6111, zip code: 13083-970,
Campinas, SP, Brazil.

Tel.: 55 19 35219215

Fax: 55 19 32894107

Email address: costa@fcm.unicamp.br

Submetido em 13/07/2009 a: International Journal of Infectious Diseases

Abstract

Background: After 100 years of research, Chagas disease (CD) remains an important public health problem in Latin America. Symptomatic chronic phase is usually characterized by cardiac or digestive commitment and its current diagnosis relies on the measurement of *T. cruzi*-specific antibodies produced in response to the infection. However, detection of parasite DNA in seronegative persons has been reported.

Objectives: Prevalence of CD in a population with esophageal disorders was assessed by conventional serology. We also detected *T. cruzi* DNA in blood samples of seronegative and inconclusive patients by N-PCR (nested-PCR).

Methods and Results: A seroprevalence of 79% for CD in 512 patients with esophageal disorders was determined by ELISA and IIF. Out of 41 blood samples, N-PCR was positive in 31 (76%) cases when serology was negative or inconclusive.

Conclusion: As all patients presented suggestive clinical signs of digestive form of CD and most of them were born in endemic areas, we highlight the importance of diagnosis improvement and its implication in blood banks screening. Our data suggest that N-PCR seems to be effective for detection of *T. cruzi* DNA in patients with inconclusive or negative serology and, eventually, it may be useful to clarify megaesophagus etiology.

Keywords: Chagas Disease, *Trypanosoma cruzi*, Polymerase Chain Reaction, Esophageal Motility Disorders

Introduction

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of CD that currently affects approximately 12 million persons, mainly in Latin America.¹ However, increasing travel and immigration lead to emerging cases in North America and Europe.²⁻⁴ Despite efficient vector control programs launched in South America to restrict its spread and the screening of blood banks, CD still remains challenging and 40 million persons are under risk of infection.⁵ Parasites are usually transmitted by some haematophagus species of triatomine bugs from Reduviidae family. In June 2006, Brazil was formally declared free of CD transmission due to *Triatoma infestans* but still there are other mechanisms of transmission including blood transfusion, congenital route, organ transplantation, contaminated food and laboratory accidents.⁶ Chagasic infection has a variable clinical presentation and its progression depends on the initial inoculum, the genetic diversity of *T. cruzi* and the host immune response. In the early stages of infection, parasites can be detected in bloodstream and symptoms are usually mild and nonspecific. The chronic phase appears 2-4 months after infection and, initially, no symptoms are observed; this clinical latency characterized by low and intermittent parasitemia may last throughout life. Up to 30% of infected persons eventually develop clinical forms of the disease with cardiac or digestive involvement usually 10-15 years after infection.⁷

The commitment of digestive organs is mainly attributed to neuronal damage induced by immune and inflammatory processes elicited by the presence of *T. cruzi*.⁸ Megaesophagus and megacolon are the most notable and extensively organs studied in digestive CD; they are observed in about 15% of chronic patients in disease-endemic areas and this is a common condition in western part of Minas Gerais and Goiás State in Brazil.^{9,10}

Idiopathic megaesophagus and megacolon are rare conditions in our country. For this reason, when such clinical forms are observed and the patient has positive epidemiology for the disease, Chagas etiology should be sought. Nevertheless, serodiagnosis may not indicate chagasic infection and the disease etiology is sometimes attributed empirically.¹¹

Standard diagnosis in chronic phase of CD relies on detection of IgG anti-*T. cruzi* by serologic tests. The use of a complex mixture of parasites antigens in most conventional tests increases the probability of false-positives because of cross-reactivity with other protozoa.¹² On the other hand, false-negative results may also occur,^{13,14} which makes the diagnosis of *T. cruzi* infection a challenge.

Alternatively, molecular approaches have been studied to overcome serodiagnosis limitations. The development of polymerase chain reaction (PCR)-based strategies allows an accurate diagnosis of several etiologic agents. Many different protocols have been described using as target *T. cruzi* kinetoplast DNA (kDNA) and repeated satellite sequences. Using N-PCR for amplification of a 149 bp satellite DNA fragment, Marcon et al.¹⁵ reported a good specificity and sensibility for parasite detection in blood samples of chronic patients and patients with doubtful serologic tests. Considering difficulties related to differential diagnosis, in this study N-PCR was employed to evaluate the efficacy of this method to detect *T. cruzi* DNA in blood of patients with esophageal motility disorders and, eventually, clarify disease etiology.

Patients and Methods

Patients

A retrospective study investigated seroprevalence for *T. cruzi* in 512 persons with esophageal motility disorders followed at Clinical Hospital of the University of Campinas, from 1999 to 2007. From this population, we recruited 41 patients with negative or inconclusive conventional serologic tests for CD. The diagnosis of megaesophagus was established based on clinical data and radiologic studies. Ten patients with digestive involvement and seropositives for CD were studied as positive control group in order to assure PCR sensitivity. Blood specimens from 5 healthy persons with no epidemiologic suspicion of CD were used as negative control.

Serologic Tests

For patients included in this study, two serologic assays with different methodological principles were performed to detect *T. cruzi* infection: indirect immunofluorescence (IIF) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Samples were classified according to serologic tests status: positive when IIF \geq 1:40 and ELISA reactive; negative when IIF \leq 1:40 and ELISA non-reactive and inconclusive if results did not fit any of the previous criteria.

DNA Isolation and Nested PCR Assay

Genomic DNA isolation from 4 mL of EDTA-peripheral blood was performed as previously described by Sambrook & Russel,¹⁶ with some modifications. For N-PCR assays 1 μ L of extracted DNA was amplified at least in duplicate.

N-PCR assay was based on a procedure described by Marcon et al.¹⁵. DNA amplification was carried out in a 20 μ L reaction mixture containing 10 mmol/L Tris (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L of each dNTP, 0.1 mmol/L of each primer and 1 U of *Taq* DNA polymerase. For the first reaction, primers TCZ1

(forward 5'-CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT-3') and TCZ2 (reverse 5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') were used and in the second round, 1 μ L of amplified DNA was re-amplified using TCZ3 (forward 5'-TGCTGCA(G/C)TCGGCTGATCGTTTTTCGA-3') and TCZ4 (5'-reverse CA(A/G)G(C/G)TTGTTTGGTGTCCAGTGTGTGA-3'). Annealing temperatures used were 65 °C and 55 °C for the first and second rounds, respectively. The 149 bp amplicon was separated by electrophoresis on 2% agarose gel and visualized by ultraviolet transillumination after staining with Blue Green Loading Dye (LGC Bio). In addition, amplification of β -globin gene for each sample allowed checking DNA quality and the absence of inhibitors. To avoid false positive results because of PCR contamination, first and second runs were set up in distinct laboratory areas and a reaction mixture with no DNA was included in each reaction set.

Results

Seroprevalence for CD determined by conventional serologic tests (IIF and ELISA) was 79% (404/512) in patients with esophageal disorders. Results were inconclusive and negative in 31/512 (6%) and 78/512 (15%) samples, respectively. Forty-one patients (women = 22; men= 19) with inconclusive and negative results were enrolled to repeat serologic tests and to proceed molecular assays. We considered as most recent serology the results obtained in the same day that blood collection for PCR procedure.

Clinical and epidemiologic profiles of patients included in this study are shown in Table 1. Results of IIF and ELISA for 29/41 (71%) samples were negative and 12/41 (29%) were inconclusive. All patients had megaesophagus and 5/41 (12%) also had

megacolon. Megaesophagus stage was determined according to Rezende¹⁷ in 35 cases: 21/35 (60%) corresponding to grade I, 13/35 (37%) grade II and 1/35 (3%) grade III. Cardiac abnormalities compatible to chagasic cardiomyopathy were also found in at least 10/41 (24%) patients.

T. cruzi DNA was detected by N-PCR amplification in 31 (76%) of 41 samples and was more frequently found in patients born in disease-endemic areas than those born in non endemic areas (27 and 4 positive cases, respectively). When considering only the seronegative patients, N-PCR was positive in 23/29 (80%) samples. Among those with inconclusive conventional serology, N-PCR was positive in 8/12 (67%) (Table 2). N-PCR was considered inconclusive in 3 cases, it means disagreement among at least four different results. No DNA amplification for all negative controls assured the specificity of N-PCR.

Discussion

After 100 years of research, CD still remains an important public health problem. Recent outbreaks of oral infection with *T. cruzi* in Brazil and emerging cases in Europe and USA due to migratory movements are situations that require improvement in diagnostic and clinical knowledge. The high seroprevalence of CD observed in patients with esophageal disorders in this study corroborates other reports that suggest esophagopathy as a good marker of chagasic infection in Brazil.^{10, 18, 19}

Current laboratory criteria for characterizing patients with CD are based on positive serologic tests. Indeed, determination of infection status by serologic analysis has been faulty and may lead to misdiagnosis.²⁰ PCR-based assays have been exhaustively

reported and they seem to be an efficient method for reliable and easy detection of *T. cruzi* DNA.^{21-24, 15, 25, 26} Once in a large number of copies in the genome, *T. cruzi* satellite DNA is an appropriate target for a specific PCR-based diagnosis of CD in blood samples, which provides high sensitivity.²⁷ In addition, TCZ1 and TCZ2 do not prime amplification of sequences in other protozoa closely related phylogenetically to *T. cruzi*, avoiding false positive results.

In the present study, the N-PCR amplification of a *T. cruzi* satellite DNA sequence yielded positive results in 76% of a seronegative population with suggestive signs of digestive form of CD. Most of those patients (80.5%) were born in disease-endemic areas and reported other relatives infected. Previous reports detected positive PCR results in seronegative persons. However, none of them established a clear correlation between laboratory findings and specific clinical profiles.

In Brazil, positive PCR results were found in 3 seronegative persons from high disease-endemic area in Minas Gerais.²⁸ Studying serum samples from Bolivian children, Wincker et al.²⁹ reported 2 positive PCR results in 17 seronegative persons. Using specific PCR for *T. cruzi* kDNA, 16 positive results were reported among 34 persons with negative or inconclusive serology by Gomes et al.³⁰ Similarly, Castro et al.³¹ found 3 positive cases among 9 seronegative persons born in disease-endemic areas and 1 of them also had positive blood culture. Salomone et al.¹³ reported 15% of PCR positive cases studying an Argentinean population with epidemiologic risk and negative serologic findings for CD.

Trying to explain the lack of association between PCR and serologic results, authors tend to disregard contamination during molecular assays procedures since all steps are carried out in separated areas and negative controls are always used. Taking this into

account, some hypotheses have been suggested to explain this controversial condition. A central point concerns about immune response in patients infected by *T. cruzi*. Despite chronic infection, humoral response may not develop or be detected by conventional serology in some patients. Brénière et al.³² reported specific immunosuppression in seronegative persons with chronic CD and assert that some *T. cruzi* strains may not induce the production of specific antibodies.

Regarding digestive involvement, a Brazilian study showed the absence of specific antibodies verified by successive negative conventional serologic tests in 26 persons from a population with megaesophagus and epidemiologic antecedents for CD. In addition, *T. cruzi* was detected by xenodiagnosis in 2 of the 26 seronegative samples.³³ These reports highlight the possibility that serologically negative persons with *T. cruzi* infection detectable only by PCR may be more common than expected. The high seronegativity rate revealed in our study emphasizes the importance of diagnosis improvement, especially in blood donor screening.

In summary, our findings suggest that, although serologic tests may be performed for diagnostic purposes when chagasic infection is suspected, they may not be suitable in some particular situations. Interestingly, some patients enrolled in our study had cardiac abnormalities compatible with chagasic infection associated to digestive manifestations. We want to emphasize that, beyond serologic investigation, clinical and epidemiologic data must be considered to determine disease etiology. Although PCR seems to be an efficient method to detect of *T. cruzi* DNA, it also shows limited sensitivity in patients with very low or intermittent parasitemia; moreover, distinct protocols may lead to different results. Further standardization studies should be

encouraged in order to overcome technical limitations and validate PCR-based assays for diagnosis of CD.

Acknowledgments

We thank patients for their participation in this study, laboratory members and Clinical Hospital staff for their support. This work was supported by CAPES and FAEPEX.

Conflict of interest: there is no conflict of interest related to this article.

The research protocol was approved by the Research Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (no. 779/07) and Informed Consent was obtained from all participants.

References

1. Dias JCP, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41:193-6.
2. Milei J, Guerri-Guttenberg RA, Grana DR, Storino R. Prognostic impact of Chagas disease in the United States. *Am Heart J.* 2009;157:22-9.

3. Le Loup G, Lescure FX, Develoux M, Pialoux, G. Chagas disease: clinical aspects and treatment in non-endemic countries. *Presse Med.* 2009 Apr 4. Epub ahead of print.
4. Jackson Y, Myers C, Diana A, Marti HP, Wolff H, Chappuis F et al. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:601-3.
5. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006;22:583–8.
6. World Health Organization. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 811. Second report of the WHO Expert Committee, Geneva. 2002.
7. Tarleton, RL, Zhang, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today.* 1999;15:94-9.
8. Ribeiro, BM, Crema, E, Rodrigues V Jr. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. *Hum Immunol.* 2008;69:484-9.
9. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001;1:92-100.

10. Peñaranda-Carrillo R, Castro C, Rezende J, Prata A, Macêdo V. Radiographic study of the oesophagus of chagasic patients in 25 years of the Mambáí Project. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39:152-5.
11. Adad SJ, Souza MA, Silva GB, Carmo Junior J, Godoy CA, Micheletti AM. Acquired non-Chagas megacolon associated with the use of psychiatric medication: case report and differential diagnosis with Chagas megacolon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41:293-5.
12. Moncayo A, Yanine, MIO. An update on Chagas' disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol.* 2006;100:663-77.
13. Salomone AO, Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Reyes ME, Omelianuk M et al. *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:1558-62.
14. Umezawa, ES, Luquetti, AO, Levitus, G, Ponce, C, Ponce E, Henriquez D et al. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J Clin Microbiol.* 2004;42:449-52.
15. Marcon GEB, Andrade PD, de Albuquerque DM, Wanderley JS, de Almeida EA, Guariento ME, et al. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002;43:39-43.

16. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd ed. 2001.
17. Rezende J, Lauer KM, de Oliveira A. Clinical and radiological aspects of aperistalsis of the esophagus. *Rev Bras Gastroenterol.* 1960;12:247-62.
18. Kamiiji MM, de Oliveira RB. Features of Chagas' disease patients with emphasis on digestive form, in a tertiary hospital of Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38:305-9.
19. Sanchez-Lermen R de L, Dick E, Salas, JA, Fontes, CJ. Upper gastrointestinal symptoms and esophageal motility disorders in indeterminate Chagas disease patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40:197-203.
20. Cooley G, Etheridge RD, Boehlke C, Bundy B, Weatherly DB, Minning T et al. High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:e316.
21. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1477-82.
22. Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Borges Pereira J, Coura JR et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic

- patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol*. 1995;81:462-71.
23. Carriazo CS, Sembaj A, Aguerri AM, Requena JM, Alonso, C, Bua J et al. Polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998;30: 183-6.
24. Machado EM, Alvarenga NJ, Romanha AJ, Grisard EC. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95:863-6.
25. Vera-Cruz JM, Magallón-Gastelum E, Grijalva G, Rincón AR, Ramos-García C, Armendáriz-Borunda J. Molecular diagnosis of Chagas disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitol Res*. 2003;89:480-6.
26. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano, M, Carlier Y et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:574-82.
27. Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira, N, Lizardi P. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:3356-60.

28. Ávila HA, Pereira JB, Thiemann O, Paiva E, Degrave W, Simpson L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2421-6.
29. Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM et al. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Lett.* 1994;124:419-24.
30. Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Galvão LMC, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol.* 1998;88:28-33.
31. Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LM. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 2002;88:894-900.
32. Brénière SF, Poch O, Selaes H, Tibayrenc M, Lemesre J, Antezana G et al. Specific humoral depression in chronic patients infected by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop.* 1984;26:254-8.
33. Luquetti AO. Megaesôfago e anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev Goiana Med.* 1987;33:1-16.

Table 1. Epidemiologic and clinical characteristics of patients with negative or inconclusive serologic findings

Patient	Age	Sex	Origin	Clinical form ^a	Treatment	Last serologic tests ^b			N-PCR
3	80	F	EN	ME	S	D	D		Positive
4	64	M	EN	ME II	S	P	N		Positive
5	51	F	EN	ME II	S	N	N		Positive
6	52	F	EN	ME II	S	N	N		Positive
7	57	M	EN	ME III	-	N	N		Positive
8	54	F	EN	ME	S	N	N		Positive
10	64	F	EN	ME I	-	N	N		Positive
12	40	M	NON	ME I	-	P	N		Positive
14	62	M	EN	ME I	S	N	N		Positive
15	44	M	EN	ME I	-	N	N		Positive
16	56	M	EN	ME	S	N	N		Positive
17	68	M	EN	ME II	S	N	N		Positive
18	52	F	EN	ME I	-	N	N		Positive
19	71	M	EN	ME MC	S	P	1/20		Positive
20	51	M	EN	ME I MC	S	N	N		Positive
22	63	M	EN	ME MC	S	N	N		Positive
23	64	F	NON	ME II	S	N	N		Positive
25	71	M	EN	ME II	S	N	N		Positive
26	31	F	NON	ME I	S	N	N		Positive
28	36	M	EN	ME I	S	N	N		Positive
30	29	F	EN	ME	S	N	N		Positive
31	47	F	EN	ME I	-	P	N		Positive
32	62	M	EN	ME II	S	P	1/10		Positive
33	33	F	NON	ME II	S	N	N		Positive
35	53	F	EN	ME I	-	N	N		Positive
36	59	M	EN	ME I	-	D	D		Positive
37	44	M	EN	ME I	S	N	N		Positive
38	55	F	EN	ME II	S	N	N		Positive
39	52	F	EN	ME I	-	N	N		Positive
40	62	M	EN	ME II	S	P	1/10		Positive
41	54	F	EN	ME II MC	S	N	N		Positive
1	68	F	EN	ME II	S	N	N		Negative
9	27	F	NON	ME I	S	N	N		Negative
11	22	M	NON	ME I	S	N	N		Negative
13	21	F	NON	ME I	S	N	N		Negative
21	33	F	EN	ME I	-	P	N		Negative
27	41	M	EN	ME I	-	P	1/10		Negative
34	33	M	NON	ME II	S	N	N		Negative
2	34	F	EN	ME I	-	P	1/10		Inconclusive
24	69	F	EN	ME I MC	-	P	N		Inconclusive
29	51	F	EN	ME I	S	N	N		Inconclusive

*N-PCR, nested-polymerase chain reaction; EN, disease-endemic area; NON, disease non-endemic area; ME, megaesophagus; MC, megacolon; S, surgery; P, positive; N, negative; D, doubtful.

^aMegaesophagus stage according to Rezende et al., 1960.

^bELISA and IIF titles.

Table 2. Comparison of conventional serology and N-PCR

		N-PCR		
		Positive	Negative	Inconclusive
Negative serologic tests	29	23	5	1
Inconclusive serologic tests	12	8	2	2
Total	41	31	7	3

CONCLUSÕES

- Utilizando exames sorológicos convencionais para doença de Chagas (ELISA e IFI), observou-se uma prevalência de 79% em uma população com esofagopatia (n= 518). Este alto índice corrobora estudos prévios que indicam a esofagopatia como um bom marcador da infecção chagásica no Brasil.
- Na mesma população, foram encontrados 6% e 15% de resultados sorológicos inconclusivos e negativos, respectivamente.
- A detecção de um fragmento de DNA satélite de *T. cruzi* pela técnica de N-PCR foi possível em 75,6% de casos com sorologia inconclusiva ou negativa. A partir destes resultados, podemos inferir que dos 41 pacientes estudados, 31 deles, embora com diagnóstico sorológico não confirmado, são portadores de doença de Chagas. Neste sentido, deve-se enfatizar a importância da investigação da história clínica e epidemiológica do paciente independente dos resultados dos exames sorológicos de rotina.
- A maior sensibilidade da N-PCR em relação à sorologia convencional para esclarecimento da etiologia do megaesôfago nos casos estudados reforça a necessidade de se estabelecer um protocolo consenso para validação do diagnóstico molecular para doença de Chagas.
- Novos estudos devem ser realizados a fim de minimizar as limitações que a PCR qualitativa apresenta. O desenvolvimento e aprimoramento de sistemas de PCR em tempo real serão úteis tanto no monitoramento terapêutico quanto no esclarecimento da etiologia chagásica nos casos em que a sorologia convencional é falha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersson J. Molecular diagnosis of experimental Chagas' disease. Trends Parasitol. 2004 Feb;20(2):52-3.

Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am J Trop Med Hyg. 1999 May;60(5):726-32.

Araújo FG. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and antibodies related trypanosomatids. Infect Immun. 1986 Jul;53(1):179-85.

Ávila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. J Clin Microbiol. 1993 Sep;31(9):2421-6.

Brénière SF, Poch O, Selaes H, Tibayrenc M, Lemesre JL, Antezana G et al. Specific humoral depression in chronic patients infected by *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1984 Sep-Oct;26(5):254-8.

Brénière SF, Carrasco R, Antezana G, Desjeux P, Tibayrenc M. Association between *Trypanosoma cruzi* zymodemes and specific humoral depression in chronic chagasic patients. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989 Jul-Aug;83(4):517.

Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993 Jan-Mar;88(1):171-2.

Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JR et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. Experimental Parasitol. 1995 Dec;81(4):462-71.

Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104(4):122-35.

Brumpt E. O xenodiagnóstico. Aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e, em particular, à tripanosomose de Chagas. An Paul Med Cirurg. 1914;3: 97-102.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LM. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 2002 Oct;88(10):894-900.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2007 Feb 23;56(7):141-3.

Chagas C. Nova tripanozomiase 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 Ago;1(2):159-218.

Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari, CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. Rev Bras Med Trop. 1989 Jan-Mar;22(1):19-23.

Chiari E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:299-300.

Chiler TM, Samudio, MA, Zouler, G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas disease and leishmaniasis. Am J Trop Hyg. 1990 Dec;43(6):650-6.

Cimerman B & Cimerman, S. Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 390 p.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:113-22.

Coura JR & Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104(4):31-40.

Crema E, Cruvinel LAF, Werneck AM, Oliveira RM, Silva AA. Correlação manométrico-radiológica e sua importância no tratamento cirúrgico do megasôfago chagásico. Rev Soc Bras Med Trop. 2003 36(6):665-9.

De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Int Rev Cytol. 1984;86:197-283.

De Souza W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:17-36.

Dias JCP & Coura JR. Epidemiologia. In: Dias JCP, Coura JR (orgs). Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral. 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997.

Dias JCP & Schofield CJ. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1998 Ago 31(4):373-83.

Duffy T, Bisio M, Altchek J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(4):e419. Epub 2009 Apr 21.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science. 2005 Jul 15;309(5733):409-15.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using miniexon and ribosomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg. 1998 Jun;58(6):807-11.

Ferreira A & Ávila SLM. Laboratory diagnosis of Chagas' heart disease. Sao Paulo Med J. 1995 Mar-Apr;113(2):767-71.

Ferreira MS, Lopes ER, Chapadeiro E, Dias JCP, Luquetti AO. Doença de Chagas. Tratado de Infectologia. Veronesi R, Focaccia R (eds). São Paulo: Ed. Atheneu, 1996.

Ferreira AW, Belem ZR, Lemos EA, Reed SG, Campos-Neto A. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. J Clin Microbiol. 2001 Dec;39(12):4390-5.

FIOCRUZ – Fundação do Instituto Oswaldo Cruz. Centenário da Descoberta da Doença de Chagas. Disponível em: <[http:// www.fiocruz.br/chagas/](http://www.fiocruz.br/chagas/)>. Acesso em: 10 nov. 2008.

FUNASA - Fundação Nacional da Saúde. Tratamento etiológico da doença de Chagas. Gerência técnica da doença de Chagas. 2ed. Brasília, 1997, p.32.

Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. Am J Trop Med Hyg. 1999 Feb;60(2):205-10.

Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizardi PM. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. Proc Natl Acad Sci USA. 1984 Jun;81(11):3356-60.

Jackson Y, Myers C, Diana A, Marti HP, Wolff H, Chappuis F et al. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. Emerg Infect Dis. 2009;15(4):601-3.

Junqueira AC, Chiari E, Wincker P. Comparison of polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in a endemic region of north-eastern Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996 Mar-Apr;90(2):129-32.

Kamiji MM & Oliveira RB. Features of Chagas' disease patients with emphasis on digestive form, in a tertiary hospital of Ribeirão Preto, SP. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(4):305-9.

Köberle F & Nador E. Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. Ver Paul Med. 1955 Dec;47(6):643-61.

Lages-Silva E, Crema E, Ramirez LE, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. Am J Trop Med Hyg. 2001 Nov;65(5):435-41.

Lescure FX, Canestri A, Melliez H, Jauréguiberry S, Develoux M, Dorent R et al. Chagas disease, France. *Emerg Infect Dis*. 2008 Apr;14(4):644-6.

Luquetti AO. Megaesôfago e anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev Goiana Med*. 1987 33:1-16.

Luz ZMP. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:295-8.

Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SDJ. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol*. 1992 Oct;55(1-2):147-53.

Maldonado C, Albano S, Vettorazzi L, Salomone O, Zlocowski JC, Abiega C et al. 2004. Using polymerase chain reaction in early diagnosis of re-activated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. *J Heart Lung Transpl*. 2004 Dec;23(12):1345-8.

Malta J. *Doença de Chagas*. São Paulo: Sarvier, 1996. 202pp.

Manoel-Caetano Fda S, Carareto CM, Borim AA, Miyazaki K, Silva AE. kDNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* in blood and oesophageal mucosa from chronic chagasic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008 Nov;102(11):1102-7. Epub 2008 Jul 9.

Marcon GE, Andrade PD, de Albuquerque DM, Wanderley Jda S, de Almeida EA, Guariento ME, Costa SC. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 May;43(1):39-43.

Mendes RP, Hoshino-Shimizu S, Moura da Silva AM, Mota I, Heredia RA, Luquetti AO, Leser PG. Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol*. 1997 Jul;35(7):1829-34.

Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1977;71(3):217-25.

Miles MA, Lanham SM, de Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74(2):221-37.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2005;38 Supl. III:12-4.

Moncayo A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;1:401-4.

Moncayo A & Yanine, MIO. An update on Chagas' disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*. 2006 Dec;100(8):663-77.

Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004 Sep;54(Pt 5):1861-75.

Morel C, Chiari E, Plessmann Camargo E, Mattei Dm, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of Kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Nov;77(11):6810-4.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989 Jul;27(7):1477-82.

MSF (Médecins Sans Frontières). International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 May-Jun;41(3):315-9.

Muñoz J, Gómez i Prat J, Gállego M, Gimeno F, Treviño B, López-Chejade P, Ribera O, Molina L, Sanz S, Pinazo MJ, Riera C, Posada EJ, Sanz G, Portús M, Gascon J. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop*. 2009 Jul;111(1):51-5. Epub 2009 Mar 5.

Neves DP. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494pp.

Olivares-Villagómez D, McCurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Oct;59(4):563-70.

Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff LV, Del Pozo A, Gaby Vercauteren AS, Sabino EC. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion*. 2009 Mar 5. Epub ahead of print.

PAHO (Pan American Health Organization). Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. 2005. Disponible em: <<http://www.who.int/tdr>>. Acesso em: 8 out. 2008.

Peñaranda-Carrillo R, Castro C, Rezende J, Prata A, Macêdo V. Radiographic study of the oesophagus of chagasic patients in 25 years of the Mambai Project. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 Mar-Apr;39(2):152-5.

Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Gómez i Prat J, Portús M, Sauleda S. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007 Sep;103(3):195-200. Epub 2007 Jun 23.

- Portela-Lindoso AA & Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saude Publica*. 2003 Feb;37(1):107-15.
- Prata A. Classificação da infecção chagásica no homem. *Rev Soc Bras Med Trop* 1990; 23(2):109- 113.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001 Sep;1(2):92-100.
- Rassi A, Rassi Júnior A, Gabriel Rassi SG. Fase Aguda. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (orgs). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- Rey L. Parasitologia. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan_1991. 856pp.
- Rezende J, Lauer KM, de Oliveira A. Clinical and radiological aspects of aperistalsis of the esophagus. *Rev Bras Gastroenterol*. 1960 Sep-Dec;12:247-62.
- Rezende JM. Comprometimento do esôfago na moléstia de Chagas. Megaesôfago e cardiopatia. *O Hospital*. 1958;53:1-15.
- Rezende & Moreira, In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (orgs). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- Ribeiro ALP & Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31: 301-14.
- Russomando G, Figueredo A, Almirón M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol*. 1992 Nov;30(11):2864-8.
- Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Sep;59(3):487-91.
- Saéz-Alquézar A, Otani MM, Sabino EC, Ribeiro-dos-Santos G, Salles N, Chamone DF. Evaluation of the performance of Brazilian blood banks in testing for Chagas' disease. *Vox Sang*. 1998;74(4):228-31.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
- Salomone AO, Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Reyes ME, Omelianuk M et al. *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease. *Emerg Infect Dis*. 2003 Dec;9(12):1558-62.

Sanchez-Lermen R de L, Dick E, Salas, JA, Fontes, CJ. Upper gastrointestinal symptoms and esophageal motility disorders in indeterminate Chagas disease patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 Mar-Apr;40(2):197-203.

Santos Júnior JCM. Megacólon – parte II: doença de Chagas. *Rev Bras Coloproct.* 2002(4):266-77.

Schmunis GA. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:93-101.

Schmunis GA. A Tripanossomíase Americana e seu impacto na Saúde Pública das Américas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (orgs). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Schofield CJ & Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol.* 1999;42:1-27.

Shikanai-Yasuda MA, Ochs DE, Tolezano JE, Kirchhoff LV. Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996 Nov-Dec;90(6):649-51.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Dec 20;83(2):141-52.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol.* 1989 Mar 15;33(3):205-14.

Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gürtler RE. The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med.* 2007 Dec;4(12):e332.

Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henriquez D et al. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J Clin Microbiol.* 2004 Jan;42(1):449-52.

Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet.* 1996 Sep 28;348(9031):891-2.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* 2000 May;156(5):1805-9.

Vaidian AK, Weiss LM, Tanowitz HB. Chagas' disease and AIDS. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2004 May 13;3(1):2.

Vera-Cruz JM, Magallón-Gastelum E, Grijalva G, Rincón AR, Ramos-García C, Armendáriz-Borunda J. Molecular diagnosis of Chagas disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitol Res.* 2003; 89(6):480-6.

Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 May;68(5):574-582.

Wanderley DM, Gonzales TT, Pereira MS, Nascimento RD, Moraes-Souza H. Control of hemotherapy and transfusional Chagas disease: 1988 and 1990. *Rev Saude Publica.* 1993 Dec;27(6):430-5.

Wendel S. Doença de Chagas Transfusional. In: Dias, JCP, Coura, JR (orgs). *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral.* 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997.

Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM et al. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Lett.* 1994 Dec 15;124(3):419-23.

World Health Organization. Control of Chagas disease. WHO Tech. Rep. Ser. 811. Second report of the WHO Expert Committee, Geneva. 1991.

World Health Organization. Control of Chagas disease. WHO Tech. Rep. Ser. 811. Second report of the WHO Expert Committee, Geneva. 2002.

World Health Organization. Chagas disease: control and elimination. WHO Report of the Secretariat to the Executive Board, 124th Session. 2008.