



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

ALLAN RODRIGO SOARES MAIA

**DETECÇÃO DO DNA DE *Trypanosoma cruzi* POR PCR-MULTIPLEX
EM SANGUE DE PACIENTES COM SUSPEITA DE DOENÇA DE
CHAGAS CRÔNICA E EM DEJETOS DE TRIATOMÍNEOS
UTILIZADOS PARA XENODIAGNÓSTICO**

FORTALEZA

2012

ALLAN RODRIGO SOARES MAIA

**DETECÇÃO DO DNA DE *Trypanosoma cruzi* POR PCR-MULTIPLEX
EM SANGUE DE PACIENTES COM SUSPEITA DE DOENÇA DE
CHAGAS CRÔNICA E EM DEJETOS DE TRIATOMÍNEOS
UTILIZADOS PARA XENODIAGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia

Orientadora: Prof^a Dr^a. Maria Jania Teixeira

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Danielle Malta Lima

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M184d Maia, Allan Rodrigo Soares.
 Detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* por PCR-Multiplex em sangue de pacientes com suspeita de doença de chagas crônica e em dejetos de triatomíneos utilizados para xenodiagnóstico/ Allan Rodrigo Soares Maia. – 2012.
 133 f. : il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2012.
 Orientação: Prof^a Dr^a. Maria Jania Teixeira.
 Coorientação: Prof^a Dr^a. Danielle Malta Lima.
1. *Trypanosoma cruzi* 2. Doença de Chagas 3. Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex 4. Triatominae I. Título.

ALLAN RODRIGO SOARES MAIA

**DETECÇÃO DO DNA DE *Trypanosoma cruzi* POR PCR-MULTIPLEX
EM SANGUE DE PACIENTES COM SUSPEITA DE DOENÇA DE
CHAGAS CRÔNICA E EM DEJETOS DE TRIATOMÍNEOS
UTILIZADOS PARA O XENODIAGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Aprovada em 23/01/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Jânia Teixeira (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Jeová Keny Baima Colares

Universidade de Fortaleza

Prof^a Dra. Cristiane Cunha Frota

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Roberto da Justa Pires Neto

Universidade Federal do Ceará

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me dado a oportunidade de obter mais essa conquista profissional, guiando-me sempre e fazendo-me escolher os melhores caminhos. E erguendo-me após as tormentas.

À minha família, pelo amparo e incentivo, em especial aos meus pais Francisco Canindé Maia Rocha e Francisca Soares Maia que sempre foram exemplos de perseverança, honestidade e caráter. Obrigado pelo amor, apoio, paciência e incentivo que me ajudaram a realizar mais um dos meus objetivos.

À Prof^a. Dr^a. Maria Jania Teixeira, pela orientação, dedicação, paciência, compreensão, pela confiança que me atribuiu, por todo o aprendizado que me proporcionou, pela sua amizade inestimável que me ajudou a conseguir a realização deste trabalho, compreendendo minhas dúvidas e apontando meus erros, auxiliando com isso meu crescimento profissional. Pois sempre serei grato pela oportunidade de trilhar um caminho em minha vida. Muito Obrigado.

À Prof^a. Dr^a Danielle Malta Lima, pela orientação, dedicação, paciência, compreensão, confiança, a quem recorri várias vezes quando precisei de ajuda, e que em nenhum desses momentos me deixou sem auxílio. Obrigado pela atenção, acolhida e pela preciosa ajuda em várias etapas da realização do trabalho. E por todas as instruções e chamadas. Obrigado.

A todos os professores que fazem parte do Laboratório de Parasitologia do DPML/UFC, Dr^a. Cristina Souza Chaves, Dr. Ivo Castelo Branco Coelho, Dr. Vladimir Michailowski Leite Ribeiro, Dr^a. Kelma Maria Souza Bastos, Dr^a. Zirlane Castelo Branco Coelho, Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu, Prof. Josias Martins Vale, Prof. Alísio Bandeira Girão, Sr^a. Lucineide de Sousa Barros, Sr. Mário Milton de Menezes, por terem me acolhido de braços abertos, pessoas maravilhosas que me proporcionaram momentos de alegria e descontração.

Ao Prof. Dr. Govindaswamy Talapala Naidu, por sempre estar à disposição em ajudar e orientar a seguir os melhores caminhos para o trabalho e para a vida. Obrigado.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto de Lavor Porto, por nossos diálogos que sempre trouxeram valorosos ensinamentos me possibilitando seguir esse caminho tão recompensador. Obrigado.

Aos inestimáveis colegas, Orleânco Gomes Ripardo de Azevedo, Pedro Almeida Pereira, Magda Marinho Braga, Monica Aline Parente por partilhar momentos que ficarão lavrados na minha história.

Aos meus amigos de laboratório: Laiane Fernanda, Juliana Montezuma, Weberty M. E. Figueiredo, Sayonara de Melo Viana, Priscila Valera Guerra, João Victor Serra Nunes, Daniela Cristina Sensato, Raissa Matos Fontes, Claudênia Costa Praciano e Mayara Araújo Brilhante, pela valiosa amizade e companheirismo.

Ao grande amigo Ronaldo Landim Bandeira pela oportunidade de resgate e manutenção do conhecimento amplo que me permitiram usá-los neste trabalho e colaboração em todos os vindouros.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal e, em especial, à secretária do Mestrado em Patologia, Paula da Paz Palácio, pela ajuda e apoio em realizar todos os assuntos administrativos.

À Coordenação do Mestrado em Patologia/UFC, pelo auxílio no percurso de todo o trabalho, pela ajuda nas dificuldades encontradas.

Aos professores do Mestrado por contribuírem na aquisição de conhecimentos essenciais à minha formação profissional.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro, pelo provimento da bolsa durante todo o trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, muito obrigado.

“In saecula saeculorum.”

(Novo Testamento – Bíblia Sagrada)

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo parasito intracelular *Trypanosoma cruzi* e afeta em torno de 17 milhões de pessoas na América Latina. A fase crônica da doença caracteriza-se por baixo nível de parasitemia e alto nível de anticorpos Anti-T.cruzi e o diagnóstico é feito preferencialmente utilizando-se métodos sorológicos, incluindo imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e imunoensaio enzimático (ELISA). São testes que apresentam alta sensibilidade, mas sofrem de baixa especificidade, e um variável número de indivíduos apresenta testes sorológicos inconclusivos. Nos últimos anos, muitos estudos têm usado a tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar sequências de DNA de *T. cruzi* em sangue de pacientes chagásicos crônicos. A alta especificidade da PCR tem apontado para sua aplicação como método confirmatório no diagnóstico de pacientes com provas sorológicas inconclusivas. O objetivo desse trabalho foi realizar uma análise comparativa entre a PCR e os métodos convencionais mais utilizados para o diagnóstico - sorologia e xenodiagnóstico, na detecção da infecção por *T. cruzi*, em indivíduos com doença de Chagas crônica. Sangue de 67 pacientes chagásicos crônicos, ambos os sexos, provenientes do ambulatório de doença de Chagas do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará, foram avaliados para *T. cruzi*, utilizando testes sorológicos (IFI, HAI e ELISA), PCR-Multiplex e xenodiagnóstico. Além disso, foi avaliado também a PCR-Multiplex em dejetos de triatomíneos provenientes do xenodiagnóstico destes pacientes. De acordo com o resultado dos testes sorológicos, os pacientes foram classificados em 3 grupos: 1°. Sorologia positiva (quando 2 ou 3 resultados dentre os 3 testes sorológicos foram positivos), 2°. Sorologia inconclusiva ou indeterminado (apenas 2 resultados foram negativos) e 3°. Sorologia negativa (quando os 3 resultados foram negativos). Dentre as 59 amostras com sorologia positiva foram obtidos 18 (30,5%) resultados positivos de PCR-Multiplex em sangue periférico e 41 (69,5%) resultados negativos. Nos PCR-Multiplex em dejetos de triatomíneos foram obtidos 20 (33,9%) resultados positivos e 39 (66,1%) resultados negativos. As 2 amostras com sorologia inconclusiva foram negativas na PCR-Multiplex, tanto em sangue periférico como em dejetos de triatomíneos. As amostras com sorologia negativa (n=6) apresentaram 2 resultados positivos (33,3%) na PCR-Multiplex em sangue e 4 resultados negativos (66,7%). Nos dejetos de triatomíneos, as 6 amostras com sorologia negativa foram negativas na PCR-Multiplex. Estes resultados mostraram que o ensaio da PCR-Multiplex em amostras de sangue periférico e em dejetos de triatomíneos, empregando iniciadores para regiões diferentes, no caso, DNA nuclear e DNA do cinetoplasto, podem ser aplicados para o diagnóstico da doença de Chagas crônica (mesmo com diferentes metodologias de extração de DNA total). Os dados mostraram também que a PCR-Multiplex em dejetos de triatomíneos é mais sensível que o ensaio do xenodiagnóstico.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas Crônica. PCR-Multiplex. Sangue Periférico. Dejetos de Triatomíneos.

ABSTRACT

The intracellular parasite *T. cruzi* is the causative agent of Chagas disease, which affects 17 million people in Latin America. The chronic phase is characterized by low parasitemia and high level of Anti-*T. cruzi* antibodies and the diagnosis is done preferably using serological methods, including indirect immunofluorescence (IIF), indirect hemagglutination (IHA) and ELISA. These tests show high sensitivity, and low specificity, and a variable number of individuals present inconclusive serological tests. Nowadays, many studies have used the technology of Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect DNA sequences of *T. cruzi* in blood of chronic chagasic patients. The high specificity of the PCR has pointed to its use as a confirmatory method for diagnosing patients with inconclusive serology. This study aimed to comparative analysis between PCR and conventional methods commonly used for diagnosis - serology and xenodiagnosis in the detection of infection by *T. cruzi* in individuals with chronic Chagas' disease. Blood of 67 chronic chagasic patients, both sex, from the Chagas' disease clinic at the Hospital Universitário Walter Cantídio, of Universidade Federal do Ceará, were tested for *T. cruzi*, using serological tests (IIF, IHA and ELISA), Multiplex PCR and xenodiagnosis. In addition, Multiplex PCR was also evaluated in the waste of triatomine bugs from the xenodiagnosis of these same patients. According to the results of serological tests, patients were classified into 3 groups: 1. Positive test results (when 2 or 3 results from the three serological tests were positive), 2. Inconclusive or indeterminate serology (when 2 results were negative), and 3. Negative serology (when 3 results were negative). Among the 59 seropositive samples that obtained 18 (30,5%) positive results of Multiplex PCR for peripheral blood and 41 (69,5%) negative results. In Multiplex PCR for waste of triatomine bugs were obtained 20 (33,9%) positive and 39 (66,1%) negative results. The two samples with inconclusive serology were negative in the Multiplex PCR for peripheral blood and for the waste of triatomine bugs. Samples with negative serology (n=6) had 2 (33,3%) positive and 4 (66,7%) negative results of Multiplex PCR for blood. For the waste of triatomine bugs, the 6 seronegative samples were negative by Multiplex PCR. These results showed that Multiplex PCR assay in peripheral blood samples and in waste of triatomine bugs, using primers for different regions, in this case, nuclear DNA and kinetoplast DNA, could be applied to the diagnosis of chronic Chagas' disease, even with different methods of extraction of total DNA. Data also showed that Multiplex PCR in waste of triatomine bugs is more sensitive than the test of xenodiagnosis.

Key words: *Trypanosoma cruzi*. Chagas Disease. PCR-Multiplex. Peripheral Blood. Stool of Triatomine Bugs.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| FIGURA 1 | Ciclo de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 19 |
| FIGURA 2 | Perspectiva de migração de pessoas oriundas da América Latina para outros países do mundo..... | 21 |
| FIGURA 3 | Princípio do teste de Hemaglutinação Indireta..... | 25 |
| FIGURA 4 | Foto parcial de placa de microtitulação de Hemaglutinação Indireta..... | 25 |
| FIGURA 5 | Lâmina para ensaio de imunofluorescência indireta (IFI)..... | 26 |
| FIGURA 6 | Visualização de <i>T. cruzi</i> por microscopia de fluorescência no ensaio de IFI..... | 27 |
| FIGURA 7 | Princípio de realização do ensaio ELISA..... | 28 |
| FIGURA 8 | Placa de microtitulação para ELISA após reação..... | 29 |
| FIGURA 9 | Resumo do roteiro de trabalho para os pacientes incluídos no estudo..... | 38 |
| FIGURA 10 | Faixas etárias (em anos) dos pacientes com Doença de chagas Crônica..... | 45 |
| FIGURA 11 | Gráfico das Macrorregiões x Número de pacientes..... | 46 |
| FIGURA 12 | Foto de gel de agarose a 1,5% revelado com Brometo de etídio (1mg/mL) para DNA total de sangue periférico..... | 48 |
| FIGURA 13 | Foto de gel de agarose a 1,5% revelado com Brometo de etídio (1mg/mL) para DNA total de solução de dejetos | 49 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| TABELA 1 | Número de amostras <i>versus</i> Sorologia (ELISA, IFI, HAI)..... | 47 |
| TABELA 2 | Número total de amostras <i>versus</i> Sorologia <i>versus</i> Xenodiagnóstico <i>versus</i> PCR-S (<i>in house</i>)..... | 48 |
| TABELA 3 | Número total de amostras <i>versus</i> Sorologia <i>versus</i> Xenodiagnóstico <i>versus</i> PCR-X (<i>in house</i>)..... | 49 |
| TABELA 4 | Ensaaios realizados <i>versus</i> Número de amostras <i>versus</i> PCR (Sangue) <i>versus</i> PCR (Dejetos)..... | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| dATP | <i>Deoxyadenosine triphosphate</i> (Desoxiadenosina trifosfato) |
| dCTP | <i>Deoxycytidine triphosphate</i> (Desoxicitidina trifosfato) |
| dGTP | <i>Deoxyguanosine triphosphate</i> (Desoxiguanosina trifosfato) |
| dNTP | <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> (Desoxirribonucleotídeo trifosfato) |
| dTTP | <i>Deoxythymidine triphosphate</i> (Desoxitimidina trifosfato) |
| DPML | Departamento de Patologia e Medicina Legal |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico) |
| EDTA | <i>Ethylenediamine tetra-acetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético) |
| EtBr | <i>Ethidium bromide</i> (Brometo de etídio) |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático) |
| FAMED | Faculdade de Medicina |
| HAI | Hemaglutinação Indireta |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HIV | <i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana) |
| HUWC | Hospital Universitário Walter Cantídio |
| IFI | Imunofluorescência Indireta |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| IPECE | Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Estado do Ceará |
| kDNA | <i>Kinetoplast DNA</i> (DNA cinetoplasto) |
| P.A | Para análise |
| pb | Pares de base |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase) |
| PFGE | <i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de campo pulsado) |
| mg | Miligrama |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| μL | Microlitro |
| mL | Mililitro |
| M.O | Microscopia Óptica |
| MP | Megapixel |
| NaCl | Cloreto de Sódio |

| | |
|-----------|---|
| nDNA | <i>Nuclear DNA</i> (DNA nuclear) |
| ng | Nanograma |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| pmol | Picomol |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico) |
| RT-PCR | <i>Reverse Transcriptase</i> – PCR (Transcriptase Reversa - PCR) |
| Taq | <i>Termus aquaticus</i> |
| T.B.E | Tris-Ácido bórico-EDTA (Tris-Borato-EDTA) |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| T.E | Tris-EDTA |
| Tris-Base | Tris(hidroximetil)aminometano [Tris-(hidroximetil)aminometano] |
| Tris-HCl | Tris(hidroximetil)aminometano hydrochloride [Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloro] |
| UFC | Universidade Federal do Ceará |
| UV | Ultravioleta |
| WHO | World Health Organization |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 | A Doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i> | 18 |
| 1.1.1 | <i>Aspectos epidemiológicos - reservatórios, vetores e ciclo de vida</i> | 18 |
| 1.1.2 | <i>Aspectos clínicos</i> | 21 |
| 1.2 | Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas crônica..... | 22 |
| 1.2.1 | <i>Xenodiagnóstico</i> | 23 |
| 1.2.2 | <i>Hemaglutinação Indireta (HAI)</i> | 24 |
| 1.2.3 | <i>Imunofluorescência Indireta (IFI)</i> | 26 |
| 1.2.4 | <i>Ensaio Imunoenzimático (ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)</i> | 28 |
| 1.3 | Reação em Cadeia de Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR)..... | 30 |
| 1.4 | Estrutura genômica do <i>T. cruzi</i> | 32 |
| 1.4.1 | <i>Elementos repetitivos do genoma do T. cruzi: DNA Satélite (nDNA) e DNA do cinetoplasto (kDNA)</i> | 33 |
| 1.5 | Aplicabilidade da PCR no diagnóstico da doença de Chagas crônica..... | 34 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 35 |
| 3 | OBJETIVOS | 36 |
| 3.1 | Objetivo Geral..... | 36 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 36 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 4.1 | Desenho do estudo..... | 37 |
| 4.2 | Espaço amostral e fluxograma do estudo..... | 37 |
| 4.3 | Aspectos éticos..... | 39 |
| 4.4 | Amostras de sangue..... | 39 |
| 4.5 | Testes sorológicos..... | 39 |
| 4.6 | Xenodiagnóstico..... | 40 |
| 4.7 | Amostras de dejetos de triatomíneos..... | 40 |
| 4.8 | Sequências de DNA alvo e iniciadores específicos..... | 41 |
| 4.9 | Extração de DNA total de amostra de sangue periférico..... | 42 |
| 4.10 | Extração de DNA total de amostra de solução de dejetos de triatomíneos..... | 42 |
| 4.11 | Quantificação de ácido nucléico (DNA)..... | 43 |
| 4.12 | Reação em Cadeia da Polimerase..... | 43 |
| 4.13 | Eletroforese..... | 44 |

| | | |
|----------|--|----|
| 4.14 | Análise estatística..... | 44 |
| 5 | RESULTADOS | 46 |
| 5.1 | Dados demográficos e epidemiológicos..... | 46 |
| 5.2 | Tipologia sorológica..... | 47 |
| 5.3 | PCR-Multiplex para sangue periférico (metodologia <i>in house</i>) comparada com o xenodiagnóstico e a sorologia..... | 48 |
| 5.3.1 | <i>Eletroforese de amostras de PCR-Multiplex de DNA total de sangue periférico (metodologia in house)</i> | 49 |
| 5.4 | PCR-Multiplex para solução de dejetos de triatomíneos (metodologia <i>in house</i>) comparada com o xenodiagnóstico e a sorologia..... | 50 |
| 5.4.1 | <i>Eletroforese de amostras de PCR-Multiplex de DNA total de solução de dejetos (metodologia in house)</i> | 51 |
| 5.5 | Comparação da PCR-Multiplex no sangue periférico e nos dejetos de triatomíneos com os testes sorológicos e o xenodiagnóstico..... | 52 |
| 6 | DISCUSSÃO | 53 |
| 7 | CONCLUSÃO | 61 |
| 8 | RECOMENDAÇÕES | 62 |
| | REFERÊNCIAS | 63 |
| | APÊNDICES | 75 |
| | A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)..... | 75 |
| | B - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE SANGUE RESSUSPENDIDAS EM 200 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-510)..... | 77 |
| | C - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE DEJETOS RESSUSPENDIDAS EM 200 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-510)..... | 81 |
| | D - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE SANGUE RESSUSPENDIDAS EM 50 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-510)..... | 85 |
| | E - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE DEJETOS RESSUSPENDIDAS EM 50 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-510)..... | 89 |
| | F - ACHADOS DE QUANTIDADE DE DNA TOTAL EM REAÇÃO DE PCR.. | 93 |

| | |
|--|-----|
| G - AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE VOLUME MÁXIMO DE SOLUÇÃO DE DNA MOLDE NO PCR (1 a 12)..... | 94 |
| H - AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE VOLUME MÁXIMO DE SOLUÇÃO DE DNA MOLDE NO PCR (13 a 23)..... | 95 |
| I - ACHADOS DAS QUANTIDADES DE INICIADORES POR REAÇÃO DE PCR..... | 96 |
| J - DADOS EPIDEMIOLÓGICOS (AMOSTRAS 1 a 34)..... | 97 |
| K - DADOS EPIDEMIOLÓGICOS (AMOSTRAS 35 a 67)..... | 98 |
| L - METODOLOGIA DO ESTUDO PILOTO E PCR-CONVENCIONAL..... | 99 |
| M - RESULTADOS DO ESTUDO PILOTO..... | 100 |
| N - EXTRAÇÃO POR KIT PARA DEJETOS E SORO (AMOSTRA 36 DE DEJETOS E AMOSTRA 36 DE SORO)..... | 101 |
| O - PAREAMENTO DOS RESULTADOS DE HAI, IFI, ELISA, PCR-CONVENCIONAL (ESTUDO PILOTO), PCR-MULTIPLEX PARA SANGUE E PCR-MULTIPLEX PARA DEJETOS DE TRIATOMÍNEOS (AMOSTRAS 1 a 34)..... | 102 |
| P - PAREAMENTO DOS RESULTADOS DE HAI, IFI, ELISA, PCR-CONVENCIONAL (ESTUDO PILOTO), PCR-MULTIPLEX PARA SANGUE E PCR-MULTIPLEX PARA DEJETOS DE TRIATOMÍNEOS (AMOSTRAS 35 a 67)..... | 103 |
| Q - ELETROFORESE DE AMOSTRAS COM ALTA POSITIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)..... | 104 |
| R - ELETROFORESE DE AMOSTRAS COM BAIXA POSITIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)..... | 105 |
| S - ELETROFORESE DE AMOSTRAS COM NEGATIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)..... | 106 |
| T - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS COM ALTA POSITIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)..... | 107 |
| U - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS COM BAIXA POSITIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)..... | 109 |
| V - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS COM NEGATIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)..... | 111 |
| X – ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 121-1..... | 113 |
| Y – ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 121-2..... | 116 |

| | |
|--|-----|
| Z - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 122..... | 119 |
| W - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR DIAZ-7..... | 122 |
| AA - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR DIAZ-8..... | 126 |
| ANEXOS | 129 |
| A - NOTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – HUWC / UFC..... | 129 |
| B - MAPA DAS MACRORREGIÕES DO ESTADO DO CEARÁ (2011)..... | 130 |
| C - ÁREAS DE RISCO DE CONTAMINAÇÃO POR <i>Trypanosoma cruzi</i> NO ESTADO DO CEARÁ..... | 131 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

1.1.1 Aspectos epidemiológicos - reservatórios, vetores e ciclo de vida

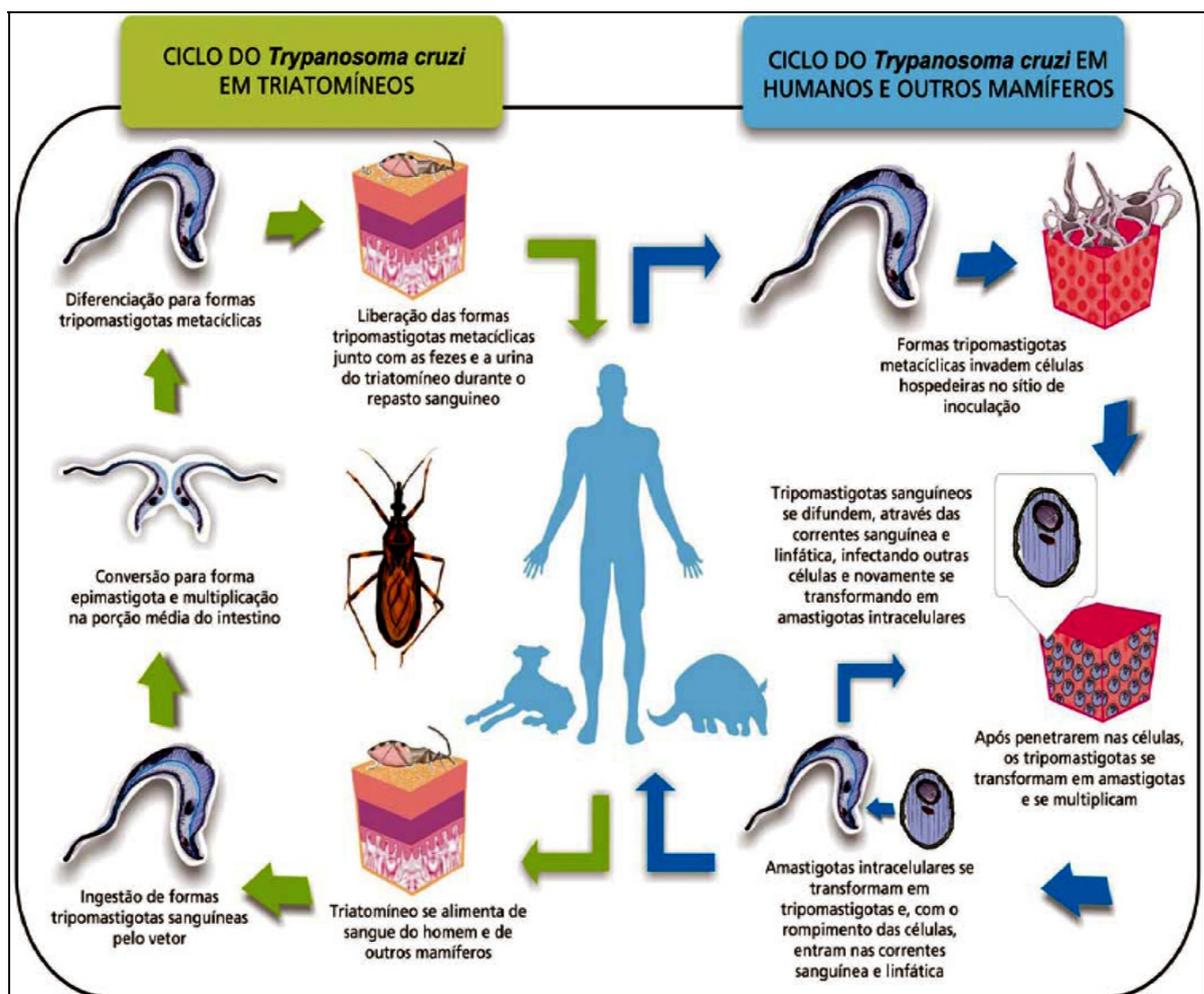
A Doença de Chagas, uma das mais importantes doenças parasitárias, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (família: Tripanosomatidae, ordem: Kinetoplastida) e afeta 16 a 18 milhões de pessoas na América Central e do Sul, com incidência anual estimada de 200 mil novos casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). De acordo com as últimas estimativas, os programas de controle em larga-escala usando inseticidas piretróides contra os vetores domésticos têm reduzido a prevalência da doença para aproximadamente 12 milhões (DIAS, 2007).

Os vetores são insetos hematófagos, os triatomíneos, pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae. Todas as 140 espécies de triatomíneos conhecidas são potenciais vetores para *T. cruzi* e a maioria são encontradas na América Latina (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009). Por causa da marcante adaptação domiciliar, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma dimidiata* são considerados os vetores mais importantes (GARCIA *et al.*, 2010). Países como Uruguai e Chile, bem como, 10 dos 12 estados endêmicos do Brasil foram certificados como livres da transmissão da doença de Chagas vetorial por *T. infestans* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000; BRASIL, 2011; BRASIL, 2011), entretanto, seus nichos foram ocupados por outras espécies como, por exemplo, *Triatoma sordida* e *Triatoma rubrovaria* (DIOTAIUTI *et al.*, 1995; ALMEIDA *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2003), evidenciando a ocorrência de sucessão ecológica.

Aproximadamente 100 espécies de mamíferos silvestres atuam como reservatórios da doença de Chagas. Um dos mais importantes reservatórios de *T. cruzi* é o gambá das espécies *Didelphis albiventris*, *D. marsupialis* e *D. guaynensis*. Neste animal, *T. cruzi* desenvolve um ciclo de reprodução no interior das glândulas anais, responsáveis pela expulsão de substâncias fétidas que servem como mecanismo de defesa e escape deste animal. E nesta substância estão presentes as formas tripomastigotas metacíclicas que podem causar infecção em outros animais e em humanos (DEANE; LENZI; JANSEN, 1984).

A transmissão de *T. cruzi* ao homem ocorre através da deposição de fezes e urina do triatomíneo infectado sobre a pele danificada ou mucosas do hospedeiro no momento do seu repasto sanguíneo. Uma vez no hospedeiro, as tripomastigotas metacíclicas invadem diversos tipos de células, transformam-se em amastigotas, multiplicam-se e após um período aproximado de quatro dias, diferenciam-se em tripomastigotas, que rompem as células infectadas e são liberadas no meio extracelular. As tripomastigotas liberadas podem invadir células adjacentes ou cair na circulação sanguínea, onde serão ingeridas pelo inseto vetor durante a alimentação, mantendo o ciclo doméstico da doença, ou irão iniciar novos ciclos multiplicativos em outros tecidos do hospedeiro mamífero (TANOWITZ *et al.*, 1992). O ciclo silvestre é mantido quando os insetos infectam animais silvestres durante o repasto sanguíneo. Na luz do intestino médio do inseto vetor, *T. cruzi* transforma-se em epimastigotas, as formas replicativas que se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante para o homem (KIRCHHOFF *et al.*, 2004) (Fig. 1).

Figura 1 - Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de Ribeiro, 2008.

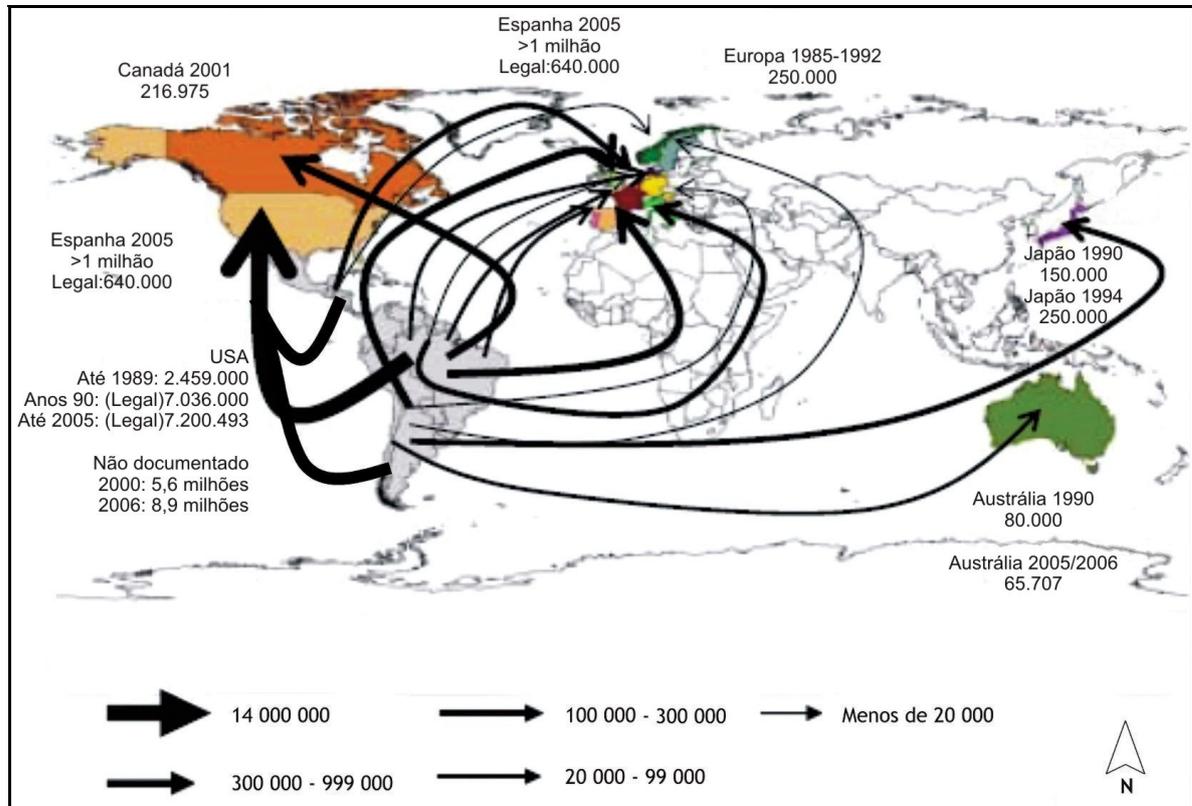
Além da transmissão vetorial, outro mecanismo responsável por aproximadamente 10% dos casos, é a transfusão sanguínea. O risco de adquirir a infecção após receber uma transfusão de sangue de um doador infectado é de aproximadamente 20% (SCHMUNIS, 1991). Este é o principal mecanismo de transmissão em zonas urbanas. O terceiro mais importante mecanismo de transmissão é a congênita, com aproximadamente 5.000 a 18.000 casos por ano. Esse tipo de transmissão também pode ocorrer fora das áreas endêmicas. Outros mecanismos esporádicos de transmissão incluem acidentes de laboratório e transplantes de órgãos (PRATA, 1994). Também têm sido descritos surtos de doença de Chagas devido à transmissão oral através de alimentos contaminados como carne, cana de açúcar ou suco de açaí (CAVALCANTI *et al.*, 2009; CAVALCANTI *et al.*, 2009; NOBREGA *et al.*, 2009).

A partir da década de 90, devido aos grandes movimentos migratórios, muitas pessoas infectadas saíram das zonas rurais para as cidades (MALLIMACI *et al.*, 2001). Por conta de tais migrações, decisões políticas acarretaram a criação de programas governamentais para o controle da transmissão vetorial, primeiro no sul do continente (Iniciativa do Cone Sul - 1991/92), e depois em países das Américas Andina e Central (Iniciativas da América Central e do Pacto Andino - 1997/98). Concomitantemente, ocorreu o melhoramento na qualidade das transfusões de sangue, devido principalmente ao aumento de indivíduos infectados com HIV (MONCAYO, 1999). Na atualidade tem-se reconhecido um melhor controle da hemoterapia no Brasil e em outros países da América Latina (MORAES-SOUZA, 1994; 1999). Comprovando isso, um relatório da Agência Nacional de Vigilância Sanitária de 2000, mostra um perfil de doadores com prevalência de anticorpos para *T. cruzi* no Brasil de 0,6%, variando de 0,3% na região Sul a 1% na região Centro-Oeste (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003).

Com o progressivo controle da transmissão vetorial na maioria dos países da América Latina (MONCAYO; SILVEIRA, 2009), muita atenção tem sido dada a possibilidade da doença de Chagas se disseminar para fora da América Latina através da doação de sangue e/ou transplante de órgãos, causada pela aumentada migração de Latino-americanos para países não endêmicos (MAGUIRE *et al.*, 2007; SCHMUNIS, 2007). Relatos de casos de doença de Chagas em outros países nos quais esta infecção não é tipicamente endêmica, tais como França, Canadá, Suíça, Dinamarca, Espanha, Alemanha e EUA, indicam que a doença deve ser considerada como diagnóstico diferencial não apenas em Latino-americanos, mas também em indivíduos que não são da América Latina (BRASIL *et al.*,

2010) (Fig. 2).

Figura 2 – Perspectiva de migração de pessoas oriundas da América Latina para outros países do mundo



Fonte: Adaptado de Schmunis, 2007.

1.1.2 Aspectos clínicos

A doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. A porta de entrada da infecção pode ser aparente ou inaparente. Quando aparente, pode ser ocular (sinal de Romaña) ou cutânea (Chagoma de inoculação). Durante a fase aguda da doença, o parasito está se disseminando e pode ser detectado por exame direto do sangue. Entretanto, na grande maioria dos pacientes, essa fase passa despercebida por causa do não reconhecimento ou pela pobreza ou ausência de manifestações clínicas (RASSI; RASSI; RASSI, 2000). Os casos sintomáticos podem apresentar ainda febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia e nos casos mais severos, miocardite e meningoencefalite. Em torno de 5 a 10% dos pacientes sintomáticos morrem durante esta fase (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Os sinais e sintomas da fase aguda da doença de Chagas normalmente desaparecem após 4 a 8 semanas. Na maioria dos indivíduos a resposta imunológica é capaz de controlar a infecção, resultando numa redução drástica da parasitemia (PRATA, 1994).

Durante a fase crônica, a infecção pode se apresentar como uma forma

indeterminada, que dependendo da área geográfica, aproximadamente 40% a 90% dos indivíduos infectados podem permanecer completamente assintomáticos e apresentarem exames radiológicos do coração, esôfago e cólon normais e eletrocardiograma sem anormalidades. No entanto, apesar de serem assintomáticos, esses pacientes apresentam reação sorológica positiva para Chagas, com xenodiagnóstico e teste de PCR que podem ser repetidamente positivos por longos períodos de tempo, evidenciando uma interação entre o parasito e o hospedeiro (DIAS; MACEDO, 2005; COURA, 2007).

Esta forma indeterminada pode persistir pelo resto da vida do indivíduo ou pode evoluir para uma forma cardíaca ou digestiva (megaesôfago ou megacólon), ou ainda uma associação de ambas as formas (cardio-digestiva) (BRENER, 1987; GUTIERREZ *et al.*, 2009; BIOLO; RIBEIRO; CLAUSELL, 2010). A forma cardíaca é a manifestação da doença de Chagas mais significativa por causa da frequência e gravidade. Geralmente aparece entre a segunda e quarta década de vida, 5-15 anos após a infecção inicial. Os sinais e sintomas da cardiomiopatia da fase crônica são causados por arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca, pelo bloqueio átrio ventricular e tromboembolismo. Na forma digestiva da doença, as manifestações clínicas são causadas pela disfunção no peristaltismo do esôfago e cólon, provocado pela destruição do plexo mioentérico, que como consequência leva a formação de megaesôfago e megacólon (REZENDE-FILHO *et al.*, 2005; COURA, 2007). A natureza das modificações miocárdicas na fase crônica tem sido considerada por alguns como um fenômeno autoimune (MICHAILOWSKY *et al.*, 2003; CUNHA NETO *et al.*, 2008; GUTIERREZ *et al.*, 2009). Entretanto, a persistência do parasito em tecidos também tem sido demonstrada (VAGO *et al.*, 2000).

Reativações da doença de Chagas foram descritas em pacientes com leucemia e com transplante de rins e coração. Imunossupressões podem reativar a doença de Chagas, ocasionando proliferação do parasito, lesões necróticas ou tumorais no cérebro (75%), e intensificação de miocardites (44%). Isto tem frequentemente ocorrido em casos de coinfeção com HIV e em transplantes de órgãos (CORDOVA *et al.*, 2008).

1.2 Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas crônica

Uma grande dificuldade no diagnóstico da doença de Chagas é que a maioria dos pacientes não apresenta sintomas na fase aguda ou crônica. Na fase aguda, o parasito está se disseminando e pode ser detectado por exame direto do sangue e por métodos parasitológicos

tais como esfregaço sanguíneo, hemocultura e xenodiagnóstico. Outra dificuldade é que, diferente de muitas doenças infecciosas, os testes parasitológicos indiretos apresentam uma baixa sensibilidade na fase crônica (BRASIL, 2005). Assim, os testes de diagnóstico recomendados na fase crônica são, principalmente, os testes sorológicos que detectam anticorpos específicos contra *T. cruzi* (PRATA, 1994).

No Brasil, tem sido recomendada a realização de pelo menos 2 testes sorológicos simultâneos (em paralelo) de diferentes técnicas: ensaio imunoenzimático (ELISA) imunofluorescência indireta (IFI) ou hemaglutinação indireta (HAI) (BRASIL, 2005). Estes testes apresentam alta sensibilidade, mas perdem especificidade por causa das reações cruzadas com outros parasitos, tais como *Leishmania* sp. e *T. rangeli* (CARVALHO *et al.*, 1993; BRITTO *et al.*, 1995; SALDANA; SOUSA 1996). Adicionalmente, os testes sorológicos apenas detectam anticorpos contra o parasito e não a presença do parasito. Esta é uma consideração importante quando se precisa decidir qual teste usar para monitorar pacientes sob tratamento para a doença de Chagas.

O Setor de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina/UFC (DPML/FAMED/UFC) recebe, em média, 150 pacientes com doença de Chagas crônica por ano, provenientes do Ambulatório de doença de Chagas do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC/UFC), e nestes pacientes são realizados o exame de xenodiagnóstico e três testes sorológicos: ELISA, IFI e HAI. Portanto, neste trabalho será dada ênfase apenas a esses testes.

1.2.1 Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico foi primeiramente descrito por Brumpt em 1914 (BRUMPT, 1914), sendo modificado em trabalhos que se seguiram ao de Brumpt (CERISOLA *et al.*, 1974; DIAS, 1940; MAEKELT, 1964; SCHENONE *et al.*, 1968), a fim de obter resultados mais apurados para a metodologia.

O ensaio consiste na utilização de ninfas de triatomíneos, livres de infecção por tripanosomatídeos, colocadas para fazerem o repasto sanguíneo diretamente no paciente. Caso o mesmo esteja infectado, os tripanosomatídeos circulantes que foram ingeridos no momento do repasto multiplicam-se ao longo de 30 a 60 dias. Decorrido este tempo de incubação, os dejetos são examinados por microscopia ótica (M.O). O procedimento pode ser natural (in vivo), quando os triatomíneos são colocados diretamente nos antebraços do paciente ou

indireto (*in vitro*), no caso do paciente apresentar alergia a picada de insetos, consistindo da retirada de uma alíquota de 2 a 3 mL de sangue do paciente que é colocado *in vitro* na presença dos insetos.

Para a execução do xenodiagnóstico em exames de rotina existe um consenso (podendo ocorrer algumas variações): emprego de 40 ninfas (geralmente de 3º estágio) distribuídas em 4 recipientes (de celulose ou plástico) que são delimitados por tela de retenção (geralmente tela de filó) e colocados nos antebraços do paciente por um período de 30 minutos. Aproximadamente 30 dias depois, o material do trato intestinal dos insetos é centrifugado, o precipitado formado é ressuspendido em solução salina e visualizado por M.O. Aconselha-se a repetição do procedimento, no mínimo mais de uma vez, em intervalos de tempo que compreendam 30 dias entre um procedimento e outro (SCHENONE *et al.*, 1968).

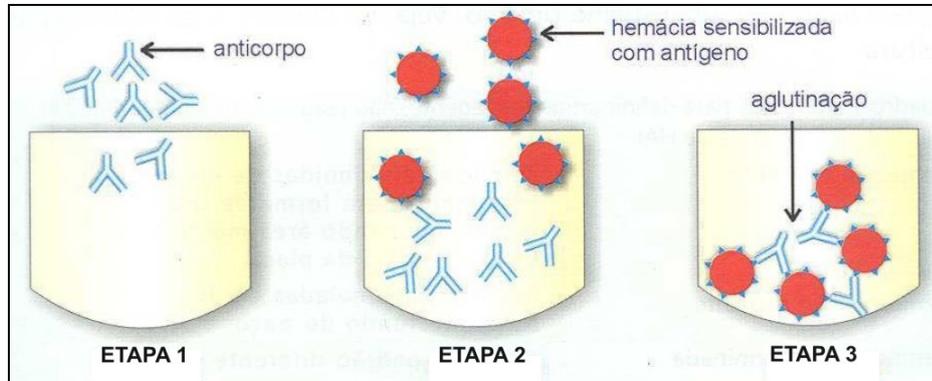
O xenodiagnóstico é o exame parasitológico mais aplicado na forma crônica da doença, registrando-se positividade entre 9% a 87,5%. Esta variação na positividade do teste tem relação com vários fatores, entre eles, a espécie de triatomíneo utilizada para o teste, o número de ninfas aplicadas e o número de repetições do teste (BARBOSA; CZEREWUTA; OLIVEIRA, 1983; BARRETO *et al.*, 1978; CASTRO; ALVES; MACEDO, 1983; BORGES-PEREIRA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 1999). Entretanto, o emprego dessa técnica fica restrito devido sua sensibilidade e limitações outras inerentes à técnica tais como: tempo prolongado para o resultado final de até 90 dias, necessidade de criação de triatomíneos em laboratório, perdas dos insetos durante o período teste e rejeição do paciente à aplicação repetida do exame ao natural (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003).

1.2.2 Hemaglutinação Indireta (HAI)

A HAI é um ensaio muito utilizado desde sua padronização por Camargo *et al.* (1971). Limita-se a detecção de anticorpos IgG, não sendo, portanto, indicado para uso na fase aguda da doença. Tem como pontos positivos a sua facilidade de execução, a rapidez para a leitura do resultado (de 1 a 2 horas) e não empregar equipamentos sofisticados para este feito. O suporte é uma placa de microtitulação de 96 poços (com tiras de 8 cavidades – 250 uL por cavidade) com fundo em “V” ou em “U”. O teste baseia-se na aglutinação de hemácias previamente sensibilizadas com antígenos de *T. cruzi* na superfície, constituindo-se de três etapas: Na etapa 1 é adicionada uma alíquota da amostra a ser analisada, na etapa 2 é inserida uma determinada quantidade de hemácias sensibilizadas com antígeno de *T. cruzi* e

na etapa 3, se ocorrer reação antígeno-anticorpo tem-se a aglutinação das hemácias (BRASIL, 1998) (Fig. 3).

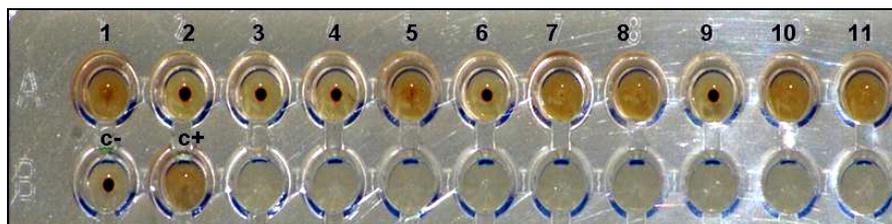
Figura 3 – Princípio do teste de Hemaglutinação Indireta



ETAPA 1 – Adição de amostra de soro humano contendo anticorpos Anti-*T.cruzi*; ETAPA 2 – Adição de hemácias sensibilizadas com antígeno de *T.cruzi*; ETAPA 3 – Reação entre anticorpos Anti-*T.cruzi* do soro humano e os antígenos de *T.cruzi* das hemácias sensibilizadas resultando em aglutinação. Fonte: Adaptado de Ático, 2003.

A leitura é efetuada a olho nu, com a placa de microtitulação posicionada contra uma fonte de luz ou um suporte com espelho ao fundo. Uma amostra é considerada reagente quando as hemácias estão distribuídas de maneira uniforme, formando uma camada (em forma de manto) ocupando uma área 50% maior que a área do fundo do poço da placa de microtitulação e coloração vermelha com tom claro. Será não reagente quando as hemácias precipitam-se ao fundo do poço formando um botão de cor vermelha em tom escuro. E será indeterminada quando apresentar-se fora de um dos padrões anteriores (BRASIL, 1998) (Fig. 4).

Figura 4 - Foto parcial de placa de microtitulação de Hemaglutinação Indireta



Amostras 1, 5, 7, 8, 10 e 11 apresentam positividade para a detecção de anticorpos Anti-*T.cruzi*; Amostras 2, 3, 4, 6 e 9 apresentam negatividade para a detecção de anticorpos Anti-*T.cruzi*; Controle negativo é indicado por (C-) e o controle positivo é indicado por (C+). Fonte: www.fio.edu.br.

O ensaio de HAI pode ser configurado para atuar de modo qualitativo ou quantitativo. Será qualitativo quando nos resultados indicarem somente se uma determinada amostra é reagente ou não reagente. Para este fim, a amostra é diluída apenas uma vez. Quando empregado de modo quantitativo terá por finalidade confirmar os resultados de amostras reagentes do modo qualitativo, bem como definir os títulos destas mesmas amostras.

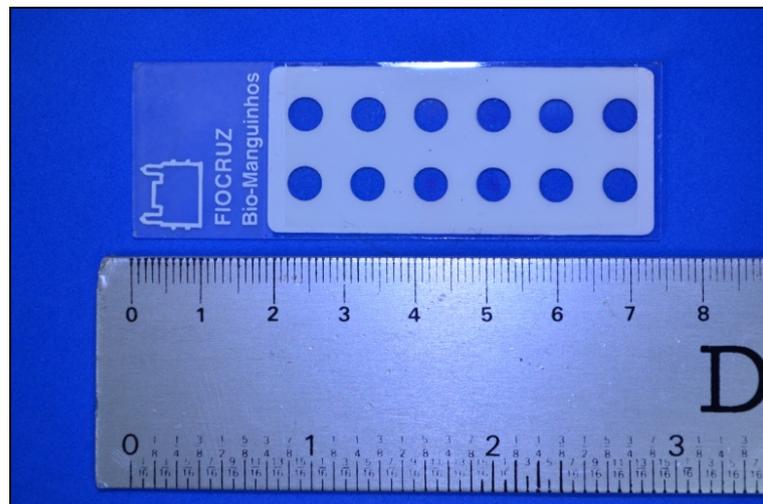
A titulação é feita com a diluição seriada do soro e todo o ensaio segue as instruções do fabricante do kit de HAI (BRASIL, 1998).

A técnica de HAI apresenta uma grande empregabilidade na rotina de diagnóstico em virtude do baixo custo da reação e fácil execução do procedimento. Alguns estudos mostram que apresenta sensibilidade de 64,6% e especificidade de 99,6% em amostras de soro e sangue em papel de filtro (ZICKER *et al.*, 1990). Por outro lado, também apresenta reações cruzadas com *Leishmania sp.*, originando resultados falso-positivos. Somando-se a isso, a leitura do resultado (por não empregar equipamentos) é subjetiva e passível de falhas de interpretação (BRASIL, 1998).

1.2.3 Imunofluorescência Indireta (IFI)

O teste de IFI é um ensaio amplamente empregado no diagnóstico sorológico de diversas doenças desde 1950. Em relação a doença de Chagas, o IFI foi padronizado com os trabalhos de Camargo (CAMARGO, 1966). O ensaio baseia-se na interação de *T. cruzi* (formas epimastigotas fixadas em lâmina) com os anticorpos anti-*T. cruzi* presentes no soro do paciente e colocado em contato com a lâmina (Fig. 5).

Figura 5 – Lâmina para ensaio de imunofluorescência indireta (IFI)

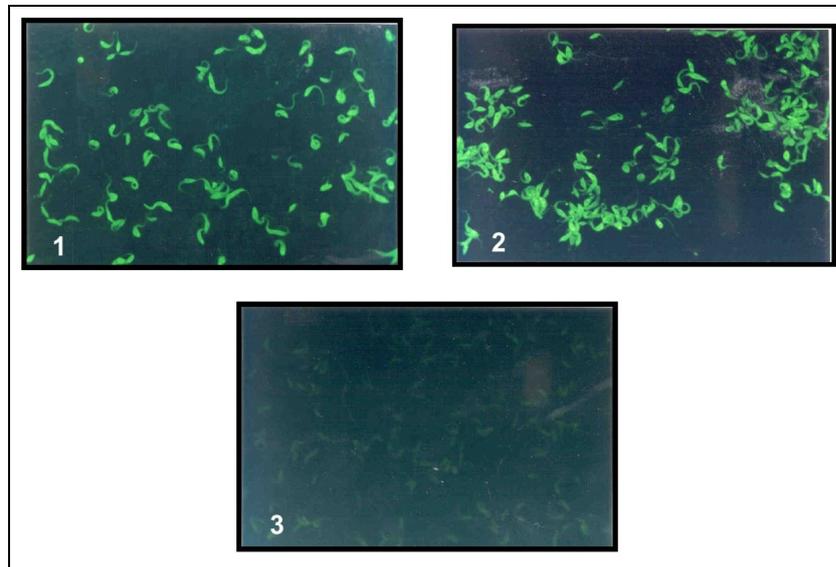


Fonte: O autor.

Na primeira etapa do ensaio, o parasito é fixado em uma lâmina de vidro com porções delimitadas para cada amostra; na segunda etapa, é adicionada uma alíquota em determinada diluição de soro do paciente que, caso seja reagente, contém anticorpos anti-*T. cruzi* presentes no soro do paciente e na terceira etapa, é adicionado um conjugado composto de anti-imunoglobulina humana (anti-anti-*T. cruzi*) ligada ao isoticianato de

fluoresceína, que vai atuar como um revelador da reação entre antígeno e anticorpo. Tal interação é visualizada em microscópio de fluorescência sob luz ultravioleta e apresenta uma coloração verde (BRASIL, 1998) (Fig. 6).

Figura 6 – Visualização de *T. cruzi* por microscopia de fluorescência no ensaio de IFI



Em 1 tem-se amostra de soro de indivíduo chagásico; Em 2 tem-se amostra de soro tomada como controle positivo; Em 3 tem-se amostra de soro tomada como controle negativo. Todas as amostras apresentam-se na diluição de 1:40. Fonte: Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ.

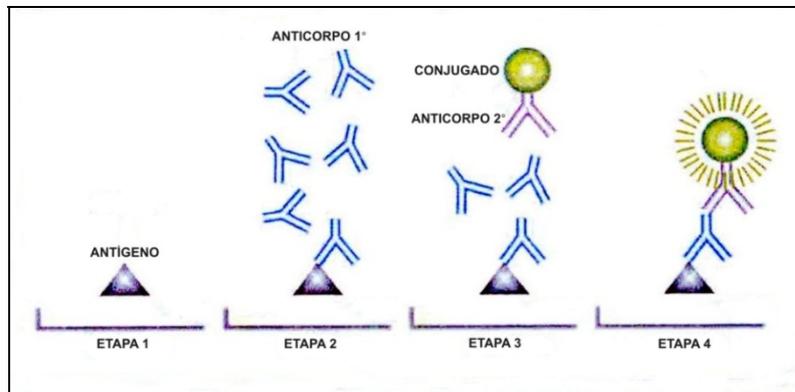
O ensaio de IFI pode ser caracterizado de duas maneiras: qualitativo ou quantitativo. A modalidade qualitativa define apenas se a mostra é reagente, não reagente ou indeterminada. Quando efetuado de modo quantitativo irá confirmar os resultados das amostras reagentes ou das amostras indeterminadas, da modalidade qualitativa, e irá definir os valores de título das amostras que foram reagentes, segundo as diretrizes dos fabricantes dos kits de ensaio (BRASIL, 1998).

A metodologia de IFI apresenta relativa praticidade em ser executada, facilidade na obtenção de reagentes (que são padronizados), elevada sensibilidade e capacidade de processar uma grande quantidade de amostras em um ensaio. Por outro lado, caracteriza-se pela leitura subjetiva das lâminas (pois não emprega equipamentos), principalmente nos casos de dedução limítrofe (*borderline*). Há trabalhos mostrando sensibilidade de 69,2% e especificidade de 99,4% (em amostras de soro e sangue em papel de filtro) para o ensaio de IFI (ZICKER *et al.*, 1990). Entretanto, alguns autores relatam a uma baixa especificidade desse teste, pois ocorre favorecimento de reações cruzadas com outras parasitoses quando em baixas titulações, por exemplo, com leishmanioses (CAMARGO; REBONATO, 1969).

1.2.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)

O teste ELISA para a detecção de anticorpos humanos contra *T. cruzi* foi primeiramente estabelecido por Voller (VOLLER *et al.*, 1975). Neste procedimento, a presença de anticorpos contra o parasito é revelada por meio de anticorpos anti-*T. cruzi* ligados a uma enzima, que na presença do seu substrato forma um produto colorido (Fig. 7). O teste ELISA empregado para o diagnóstico de *T. cruzi* é o indireto e é realizado em placas de microtitulação de 96 poços (BRASIL, 1998).

Figura 7 – Princípio de funcionamento do ensaio ELISA



ETAPA 1 – Antígeno de *T. cruzi* fixado a placa de microtitulação de ELISA; ETAPA 2 – Adição de amostra de soro humano (diluído segundo o fabricante do kit) contendo anticorpos Anti-*T. cruzi* (anticorpos primários) que se ligarão ao antígeno fixado a placa; ETAPA 3 – Adição de anticorpo Anti-*T. cruzi* conjugado a uma substância cromógena (anticorpo secundário); ETAPA 4 – ligação do anticorpo secundário ao anticorpo primário resultando em fluorescência, quando da amostra ser positiva para a detecção de anticorpos Anti-*T. cruzi*. Fonte: Adaptação de Ático, 2003.

O ensaio consiste na fixação (adsorção) de antígenos de *T. cruzi* ao fundo dos poços da placa de microtitulação que receberá as alíquotas de soro de pacientes, com uma diluição única (geralmente 1:100 ou 1:200, dependendo do kit comercial). Faz-se um procedimento de incubação com posterior lavagem seguida de adição do conjugado (composto por um anticorpo anti-IgG humana e uma enzima, peroxidase ou fosfatase alcalina). Segue-se uma nova incubação e lavagem, seguida da adição do substrato (peróxido de hidrogênio – H₂O₂) e um substância cromógena (até então incolor, que sob ação do substrato adquire coloração azul ou amarela, dependendo do conjugado) (BRASIL, 1998) (Fig. 8).

Figura 8 – Placa de microtitulação para ELISA após reação.



Poços com amostras sem coloração diferenciada (transparente) são considerados negativos, dependendo da medida do *cut-off* (estabelecido para cada ensaio); Poços com amostras com coloração em tom amarelo ou alaranjado são consideradas positivas dependendo do *cut-off* (estabelecido para cada ensaio). Fonte: www.apsnet.org.

No ensaio de ELISA o resultado da reação é definido pela leitura da absorbância ou da densidade óptica (D.O), que é uma medida objetiva do fenômeno, diferente dos ensaios de HAI e IFI (ambos subjetivos). Para cada kit de ensaio existe uma forma de se calcular o ponto de corte (*cut-off*), que é o ponto de leitura, acima ou abaixo, do qual as amostras serão consideradas reagentes, não reagentes ou indeterminadas (BRASIL, 1998). O *cut-off* também é conhecido como ponto de corte ou limiar de reatividade. As amostras indeterminadas são aquelas cujos valores de D.O estão inseridos na zona cinza (*borderline*), que compreende uma faixa de valores adjacentes ao *cut-off*, dentro do qual não se pode ter certeza de determinado resultado. Para contornar tal problemática é indicada uma posterior repetição da amostra ou das amostras inseridas neste quesito (BRASIL, 1998).

Alguns estudos apresentaram especificidade de 99,7% e sensibilidade de 78,1% em amostras de sangue coletadas em papel de filtro e soro (ZICKER *et al.*, 1990). Estudos empregando antígenos não recombinantes mostraram sensibilidade que variou de 92,0% a 99,0% e especificidade variando de 96,0% a 100,00% (KIRCHHOFF *et al.*, 2006; PIRON *et al.*, 2006). Nos estudos empregando antígenos recombinantes a sensibilidade encontrada foi de 99,0% e a especificidade de 96,0% (PIRON *et al.*, 2006). Outros trabalhos têm mostrado que o uso de antígenos recombinantes, purificados ou sintéticos, resulta em uma maior confiabilidade do teste, uma vez que pode evitar (ou reduzir ao máximo) os resultados falso-positivos, muito comuns com os antígenos convencionais (GOLDENBERG *et al.*, 1991; KRIEGER *et al.*, 1992; UMEZAWA *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002).

1.3 Reação em Cadeia de Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR)

A técnica da PCR foi desenvolvida, inicialmente, por Kary Banks Mullis, em abril de 1983, que ganhou o Prêmio Nobel em Química, juntamente com Michael Smith, em 1993 (NOBEL Prize, 2012). O ensaio da PCR consiste na amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos DNA ou RNA (neste último emprega-se a enzima transcriptase reversa no ensaio de Reverse Transcriptase, RT-PCR) com a utilização de iniciadores (*primers*), nucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dUTP), solução tampão, MgCl₂ e uma enzima termoestável, geralmente, Taq DNA polimerase (extraída do microrganismo *Thermus aquaticus*). O processo resulta em milhões de cópias a partir de um determinado seguimento molde sem a necessidade de intervenção durante o mesmo.

A PCR vem demonstrando elevada sensibilidade na detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras de pacientes com doença de Chagas (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003). Em camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi* foi observado através da PCR, empregando os iniciadores TCZ1/TCZ2 para amplificação de um fragmento de 188 pb do DNA genômico, obteve limite de detecção de até 110 fentogramas (fg) sem hibridização e de até 1,1 fg mediante uso de hibridização (empregando sondas radioativas) (MOSER; KIRCHHOFF; DONELSON, 1989). Com os mesmos iniciadores, TCZ1/TCZ2, Russomando *et al.* (1992) detectaram 55 fg de DNA de *T. cruzi* extraído de soro de macacos infectados. Comparando dois pares de iniciadores, TCZ1/TCZ2 e S35/S36, capazes de amplificar um fragmento de 188 pb do DNA genômico e um fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto, respectivamente, Kirchhoff *et al.* (1996) demonstraram melhor sensibilidade dos iniciadores para amplificação do fragmento de 188 pb, TCZ1/TCZ2, ao analisar sangue de camundongos infectados com tripomastigotas da cepa Tulahuén, de 1 a 380 dias após infecção.

Variações na sensibilidade da PCR convencional para *T. cruzi* são encontradas por diversos autores (MOSER; KIRCHHOFF; DONELSON, 1989; AVILA *et al.*, 1991, 1993). Aplicando os iniciadores TCZ1/TCZ2 e S35/S36, para amplificação dos fragmentos de 188 pb do material genético nuclear e 330 pb do material genético do cinetoplasto, respectivamente, a sensibilidade alcançada na PCR convencional, empregando DNA de epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, foi de 5 fg, o que representa menos de um parasito com os dois pares de iniciadores. Os iniciadores para amplificação dos fragmentos de 188 pb do material genético nuclear e para os fragmentos de 330 pb do material genético do cinetoplasto

vêm demonstrando sensibilidade de até 100% no diagnóstico da forma crônica (AVILA *et al.*, 1993; BRITO *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 1998; JUNQUEIRA; CHIARI; WINCKER, 1996). Com o emprego dos iniciadores BP1/BP2, que amplifica um fragmento de 692 pb do DNA nuclear, observou-se 100% de sensibilidade, comparativamente aos métodos sorológicos, em sangue de crianças com doença de Chagas na Argentina (SILBER *et al.*, 1997).

A aplicação da hibridização para detecção de DNA, amplificado por PCR convencional no sangue de pacientes, apresenta um aumento de sensibilidade em relação à leitura por gel de agarose. Estudos em determinadas regiões endêmicas detectaram em pacientes com reações sorológicas positivas para a doença de Chagas uma sensibilidade de 96,5% a 100% na PCR associada à hibridização (AVILA *et al.*, 1993; CARRIAZO *et al.*, 1998; SILBER *et al.*, 1997). No entanto, na Paraíba, Brito *et al.* (1995) observaram apenas 45% de positividade com o emprego concomitante da hibridização. Gomes *et al.* (1998), analisando sangue de pacientes com doença crônica, encontraram 50% de positividade na PCR, com iniciadores 121/122 para amplificação do fragmento de 330 pb do material genético do cinetoplasto com aumento para 83,5% ao se empregar a hibridização. Os mesmos autores, em outro trabalho, mostraram 83,5% de positividade na PCR convencional, com iniciadores 121/122 que amplificam um fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto, em pacientes com doença de Chagas crônica comprovada com reações sorológicas convencionais (GOMES *et al.*, 1999). Outros autores, no entanto, encontraram em amostras de doadores de sangue, com os mesmos iniciadores, 4,5% de positividade, alcançando 25,7% com o "nested" PCR (RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 1999).

Esses dados sugerem diferenças regionais, uma das quais seria representada por parasitemia menor e transitória, na forma crônica da doença, conforme a área geográfica estudada. No Nordeste, observou-se variabilidade de positividade de exames parasitológicos indiretos e PCR em duas áreas estudadas. No Piauí, em pacientes com doença de Chagas crônica comprovada sorologicamente, verificou-se positividade de 34% ao xenodiagnóstico, 25,7% à hemocultura e 59,5% à PCR (COURA *et al.*, 1996). No mesmo estudo, na Paraíba, os autores observaram positividade de 13% ao xenodiagnóstico e 44,6% à PCR; a hemocultura não foi realizada. Alguns fatores, que poderiam estar relacionados a tal variabilidade, não informados no trabalho, seriam o tempo de afastamento da área endêmica e a gravidade de formas clínicas. Bem como, a menores níveis de parasitemia, resultado do tempo mais prolongado de evolução da doença ou da interação entre parasitemia e hospedeiro e/ou na diferença genética dos isolados. Estudos mostraram amplificação por iniciadores de

DNA de cinetoplasto e DNA genômico em 100% dos parasitos isolados a partir de hemocultura e xenodiagnóstico de pacientes na forma crônica provenientes de várias regiões do Brasil (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003).

1.4 Estrutura genômica do *T. cruzi*

O genoma do *T. cruzi* foi mensurado empregando diferentes métodos (análise da cinética de renaturação, microfluorometria, citometria de fluxo, análises químicas e cariótipo molecular). Em estudos de renaturação, a complexidade do genoma do *T. cruzi* foi estimada em $1,8-2,5 \times 10^8$ pares de bases (CASTRO; CRAIG; CASTANEDA, 1981; LANAR; LEVY; MANNING, 1981). O conteúdo total de DNA (nuclear e cinetoplasto) varia de 0,12 a 0,33 pg por célula (LANAR; LEVY; MANNING, 1981; KOOY *et al.*, 1989; THOMPSON; DVORAK, 1989; MCDANIEL; DVORAK, 1993). O tamanho do genoma do *T. cruzi* é relativamente superior ao de outros protozoários parasitos, como por exemplo, *Leishmania* ($45-65 \times 10^6$ pb) e *T. brucei* (25×10^6 pb). Porém, a complexidade do genoma do *T. cruzi* é muito inferior frente o genoma humano, cujo tamanho é da ordem de 3.000×10^6 pb (SILVEIRA, 2000).

Uma característica marcante do *T. cruzi* é que o conteúdo total de DNA varia em diferentes cepas ou entre clones derivados de uma mesma cepa (CASTRO; CRAIG; CASTANEDA, 1981; LANAR; LEVY; MANNING, 1981; KOOY *et al.*, 1989; THOMPSON; DVORAK, 1989; MCDANIEL; DVORAK, 1993; DVORAK *et al.*, 1982). Esta variabilidade pode ter implicações na organização genômica do parasito, como por exemplo, no número de repetições de determinados genes (HENRIKSSON; ASLUND; PETTERSSON, 1996).

O material genético do *T. cruzi* está organizado em pequenos cromossomos que se condensam fracamente durante a divisão celular. Desse modo, uma análise por métodos convencionais de citogenética não é possível (SOLARI, 1980). O desenvolvimento da técnica de eletroforese em gel de campo alternado (PFGE) tem viabilizado a separação de cromossomos intactos de eucariotos inferiores, como o *T. cruzi* (GIBSON; MILES, 1986; HENRIKSSON *et al.*, 1990, 1995; HENRIKSSON; ASLUND; PETTERSSON, 1996). Conforme observado por PFGE, o genoma nuclear do parasito apresenta alta plasticidade. Os tamanhos e número de bandas cromossômicas variam entre cepas e clones do parasito (MCDANIEL; DVORAK, 1993; DVORAK *et al.*, 1982).

Em 2005 foi concluído o sequenciamento genômico da cepa CL-Brener do *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005). Os autores mostraram que mais de 50% do genoma do parasito é constituído de sequências repetidas, que incluem transposons e genes multicópias. Grande parte dos genes do *T. cruzi* que codificam proteínas estão presentes em múltiplas cópias na célula. Genes que codificam proteínas "housekeeping" e estruturais, RNA polimerases, histonas, cisteína-proteases, proteínas ribossomais, actina, Hsp70, tubulinas, calmodulinas, ubiquitinas, antígenos de superfície e enzimas da via glicolítica, estão organizados como alelos repetidos em tandem no genoma do parasito (MICHELS, 1990; ULLU; NILSEN, 1995, EL-SAYED *et al.*, 2005). Existe alguma correlação entre o número de cópias de um gene e a quantidade de seu produto na célula. Proteínas e RNAs altamente abundantes são codificados por genes com múltiplas cópias (MICHELS, 1990).

1.4.1 Elementos repetitivos do genoma do *T. cruzi*: DNA Satélite (nDNA) e DNA do cinetoplasto (kDNA)

A sequência de DNA satélite foi a primeira sequência nuclear (DNA genômico) do *T. cruzi* a ser descrita. Foi obtido com o isolamento de uma pequena fração a partir da sedimentação em gradiente de sacarose e previamente digerido pela enzima de restrição Bspl (REQUENA, 1996). Esta sequência nuclear apresenta um pequeno trecho de repetição de 195 pb. A quantidade destas repetições foi de 120.000 repetições por genoma, estimada por "dot-blot", e tomando como referência o conteúdo de DNA de 0,33 pg por célula de parasito (GONZALEZ, 1984). Nos tripanossomatídeos, a mitocôndria apresenta características peculiares, abrangendo uma complexa rede de moléculas circulares de DNA denominada de cinetoplasto ou kDNA (SILVEIRA, 2000). O kDNA consiste de uma rede de moléculas de DNA circular que constitui cerca de 20 a 25% do DNA total do parasito. O tamanho e a forma do kDNA é variável em diferentes estágios do desenvolvimento (BRENER *et al.*, 1992).

Fragmentos múltiplos de 195 pb foram observados por Sloof (SLOOF *et al.*, 1983) e Russomando (RUSSOMANDO *et al.*, 1996). Neste caso, o autor empregou os iniciadores para a amplificação de um fragmento de 188 pb (do DNA nuclear), onde, este fragmento está dentro do fragmento de 195 pb (também de origem nuclear) (GUHL *et al.*, 2002).

O kDNA compõe-se de dois tipos de moléculas circulares que diferem em tamanho e função: os minicírculos e maxicírculos. Os minicírculos apresentam, aproximadamente, 1.400 pb e estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias por célula de parasito. Possuem quatro regiões

de 120 a 160 pb, conservadas entre si e entre diferentes isolados e cepas do *T. cruzi*. Essas regiões contêm as origens de replicação do DNA. As regiões variáveis por sua vez têm cerca de 280 a 320 pb (SILVEIRA, 2000). Os maxicírculos possuem cerca de 40.000 pb de tamanho, e o número de cópias por célula varia de 20 a 50. Os genes das proteínas mitocondriais (citocromo oxidases, citocromo b, ATPases, NADH desidrogenase) e dos rRNAs mitocondriais estão localizados no maxicírculo. Portanto, pode-se considerar o maxicírculo como sendo análogo ao DNA mitocondrial dos demais eucariontes (SILVEIRA, 2000).

1.5 Aplicabilidade da PCR no diagnóstico da doença de Chagas crônica

A variabilidade de resultados pela PCR observados em diferentes regiões do Brasil e do mundo tem suscitado questões relativas à sua aplicação ao diagnóstico de doença de Chagas crônica. Com base nisso, a OMS realizou um encontro técnico (Buenos Aires, Argentina, 2007) para a realização de atividades a cerca da padronização do teste da PCR para o diagnóstico da doença de Chagas (<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdrnews/issue-82/meeting-chagas>) (acesso em 05/01/2012).

As diretrizes traçadas estipularam, em um primeiro momento, o emprego de amostras de sangue humano de pacientes chagásicos (em alíquotas de 0,5 mL) tratadas com igual volume de 6M Guanidina/HCl + 0,2M EDTA pH 8,0 e aquecidos por 15 minutos, em seguida, estabilizados a temperatura ambiente. O ensaio por biologia molecular deveria ser realizado na PCR empregando iniciadores para amplificação das regiões de 195 pb do DNA nuclear e 330 pb do DNA cinetoplasto.

Em função da necessidade de aplicação do ensaio da PCR para a rotina de diagnóstico da doença de Chagas, no presente trabalho, seguindo as diretrizes consideradas pela OMS, foi padronizado o ensaio da PCR empregando, numa mesma reação, os iniciadores DIAZ-7/DIAZ-8 para amplificação do fragmento de 195 pb e dos iniciadores 121/122 para amplificação do fragmento de 330 pb, produzindo assim, um ensaio de PCR-Multiplex a ser aplicado em amostras de sangue periférico, como também, em solução de dejetos de triatomíneos.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de uma considerável redução na incidência da infecção humana por *T. cruzi* em crianças e jovens, especialmente nos países do cone sul (Uruguai, Paraguai, Argentina, Brasil e Chile), 25% da população Latino-Americana ainda permanece sob risco de adquirir a doença. Além disso, a doença ainda é uma ameaça séria para a Saúde Pública de muitos países e por sua evolução crônica com diferentes perfis de morbi-mortalidade nas formas cardíaca e digestiva, tem também elevado impacto econômico devido a gastos decorrentes de internação, licença saúde e óbitos precoces.

A forma crônica da doença caracteriza-se por baixo nível de parasitemia e altos níveis de anticorpos. O diagnóstico laboratorial da doença nesta fase pode ser realizado por diversas técnicas, porém todas com limitações. Embora tenham ocorrido aprimoramentos no diagnóstico parasitológico da doença de Chagas crônica, a baixa sensibilidade dos exames parasitológicos indiretos, decorrente da parasitemia baixa e transitória, é ainda uma limitação para sua aplicação ao diagnóstico e controle pós-terapêutico.

Muitos estudos têm usado a tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar sequências de DNA de *T. cruzi* em sangue de pacientes chagásicos crônicos. A alta especificidade da PCR aponta para sua aplicação como método confirmatório no diagnóstico de pacientes com provas sorológicas inconclusivas e como método auxiliar no controle pós-terapêutico da doença crônica em comparação às técnicas sorológicas e parasitológicas. Com o advento de novas tecnologias e uma maior compreensão dos diversos fatores relacionados à biologia do parasito e o desenvolvimento da doença, o uso de novas estratégias de prevenção, controle e tratamento vêm sendo discutidos.

Portanto, trabalhos que discutam e comparem a aplicação dos métodos moleculares e parasitológicos indiretos no diagnóstico e da doença de Chagas crônica são ainda necessários e de grande relevância.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar uma análise comparativa entre a reação em cadeia da polimerase (PCR), a sorologia e o xenodiagnóstico, na detecção da infecção por *Trypanosoma cruzi*, em indivíduos com doença de Chagas crônica.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever os dados demográficos e epidemiológicos dos pacientes com Doença de Chagas crônica incluídos no estudo;
- Avaliar os testes sorológicos de imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e imunoenzimático em pacientes com Doença de Chagas crônica;
- Avaliar o teste parasitológico do xenodiagnóstico em pacientes com Doença de Chagas crônica;
- Avaliar o teste da PCR para detecção de material genético nuclear e do cinetoplasto de *T. cruzi* no sangue de pacientes com doença de Chagas crônica e em dejetos dos triatomíneos submetidos ao xenodiagnóstico dos pacientes com Doença de Chagas crônica.
- Comparar os resultados do ensaio da PCR com os resultados da sorologia e xenodiagnóstico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal retrospectivo observacional realizado a partir da análise de sangue periférico de indivíduos com o diagnóstico de doença de Chagas crônica e de dejetos de triatomíneos utilizados para o xenodiagnóstico nestes mesmos indivíduos.

4.2 Espaço amostral e fluxograma do estudo

No período de Julho de 2010 a Julho de 2011, um total de 151 pacientes com suspeita de Doença de Chagas crônica foram encaminhados ao Setor de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC), provenientes do Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), Fortaleza-CE, onde passaram por uma avaliação física e clínica, com eletrocardiografia convencional e radiografia do tórax.

Os critérios de inclusão do estudo compreenderam: possuir idade igual ou superior a 18 anos completos; ser do sexo masculino ou feminino; possuir número de prontuário registrado no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC); ser proveniente do Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC); possuir requisição para o exame de xenodiagnóstico a ser realizado no Setor de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC); possuir requisição para os exames de hemaglutinação, imunofluorescência indireta e imunoenzimático a serem realizados no Setor de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC) e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os critérios de exclusão do estudo compreenderam: possuir 18 anos incompletos; não possuir número de prontuário registrado no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC); não ser proveniente do Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC); não possuir requisição para o exame de xenodiagnóstico a ser realizado no Setor de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC); não possuir requisição para os exames de hemaglutinação, imunofluorescência indireta e imunoenzimático a serem realizados no Setor de Parasitologia

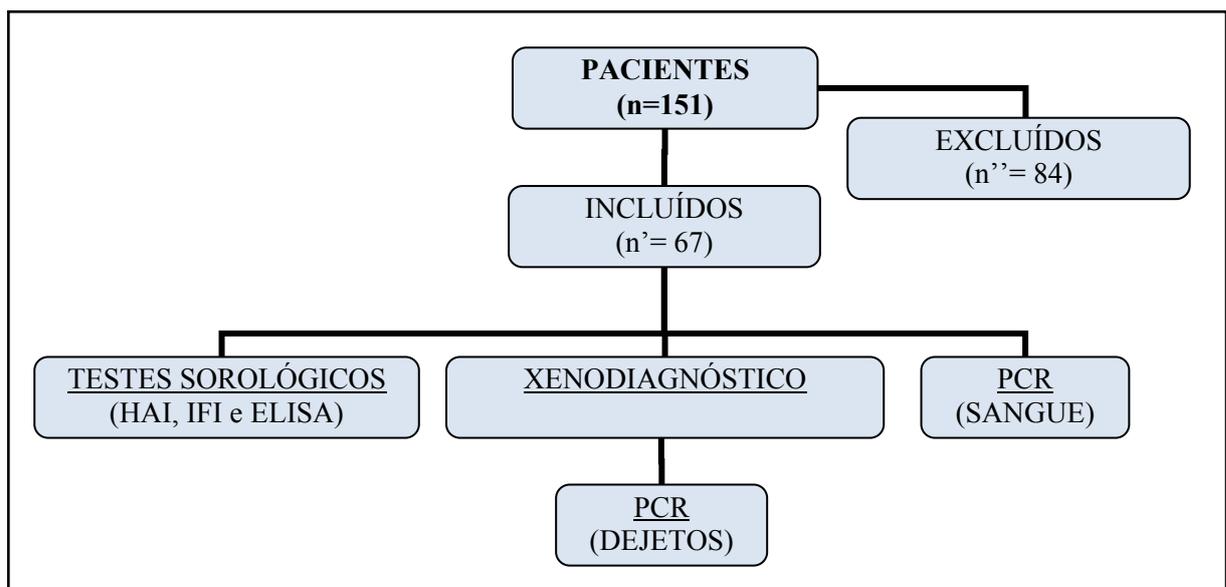
do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC) ou não assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os 151 pacientes foram esclarecidos sobre o estudo por completo e convidados a participarem do respectivo estudo. A inclusão do paciente no estudo somente se deu mediante concordância a todos os pontos dos critérios de inclusão. Bem como, a não inclusão no estudo se deu mediante a observância de quaisquer dos pontos dos critérios de exclusão.

Dos 151 pacientes convidados para o estudo, foram incluídos 67 pacientes, de ambos os sexos, com faixa etária mínima de 18 anos completos, que concordaram em participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) e foram submetidos aos três testes sorológicos (HAI, IFI, ELISA) e ao teste de xenodiagnóstico realizados no Laboratório de Parasitologia do DPML-UFC, critérios considerados de inclusão para o estudo (Figura 9).

Para todos os pacientes foi efetuada a coleta de sangue (para os ensaios de sorologia e biologia molecular) e realizado o ensaio de xenodiagnóstico, quando solicitado pelo médico responsável. Os dejetos dos triatomíneos que participaram do xenodiagnóstico foram direcionados para o ensaio de biologia molecular. O ensaio de biologia molecular foi executado por PCR em amostras de solução de dejetos de triatomíneos e sangue de pacientes (Figura 9). Os materiais dos pacientes excluídos para o estudo foram descartados seguindo normas internas do Setor de Parasitologia do DPML-UFC.

Figura 9 – Resumo do roteiro de trabalho para os pacientes incluídos no estudo



Compreende um fluxograma, onde inicia-se com a representação do espaço amostral inicial de 151 pacientes que foram convidados a participarem do estudo. Subdividindo-se em Excluídos ($n''= 84$) e Incluídos ($n'= 67$). Estes foram submetidos aos testes sorológicos [hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e imunoenzimático (ELISA)], ensaio parasitológico de xenodiagnóstico (e neste a realização do ensaio da PCR em dejetos de triatomíneos) e ensaio parasitológico da PCR em amostra de sangue periférico do paciente.

4.3 Aspectos éticos

O estudo foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do HUWC/UFC, protocolo nº 052.06.10 (ANEXO A). Todos os pacientes foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa e assinaram o TCLE, segundo a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

4.4 Amostras de sangue

Amostra de sangue venoso (± 4 mL) foi obtida de cada paciente por meio de um tubo para coleta de sangue a vácuo com EDTA (BD Vacutainer®) e destinada ao ensaio de biologia molecular. Um segundo tubo, não contendo anticoagulante foi destinado à coleta de uma segunda amostra de ± 4 mL de sangue para a realização dos testes sorológicos. As alíquotas foram originadas de um único ponto de acesso de coleta de sangue no paciente. As amostras destinadas ao ensaio da PCR foram transferidas para um tubo de 15 mL e adicionadas com igual volume de Guanidina/HCl 6M (SIGMA – St. Louis, MO - USA) + EDTA 0,2M, pH 8,0 (BIO-RAD – Hercules, CA - USA) (AVILA *et al.*, 1991). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em refrigerador a 4°C até o procedimento de extração de DNA. Todo o procedimento de tratamento da amostra foi efetuado em câmara de fluxo laminar NUAIRE MOD: NIH-03-112C (USA).

4.5 Testes sorológicos

As amostras foram analisadas através de 3 testes sorológicos. Todos os 3 testes, hemaglutinação indireta (Imuno-HAI; resultado positivo tem-se amostra com diluição $> 1:32$), imunofluorescência indireta (Imuno-COM; resultado positivo tem-se amostra com diluição $> 1:30$) e ELISA (Imuno-Elisa; resultado positivo tem-se amostra com diluição $\geq cut\ off$), foram kits produzidos pela WAMA (WAMA Diagnóstica, São Carlos – SP - Brasil) e foram realizados segundo as instruções do fabricante. De acordo com o resultado dos testes sorológicos, os indivíduos foram classificados em 3 grupos: 1°. Sorologia positiva (quando 2 ou 3 resultados dentre os 3 testes sorológicos foram positivos), 2°. Sorologia inconclusiva ou indeterminada (quando 2 resultados dentre os 3 testes sorológicos foram negativos) e 3°. Sorologia negativa (quando os 3 resultados dentre os 3 testes sorológicos foram negativos).

4.6 Xenodiagnóstico

Para cada ensaio, um por paciente, foram utilizadas 40 ninfas de *Rodnius prolixus* (3º estágio), criadas no laboratório de triatomíneos do Setor de Parasitologia do DPML/FAMED-UFC e mantidas com repastos sanguíneos em galos. Para a realização do xenodiagnóstico, os triatomíneos foram submetidos ao repasto sanguíneo por 30 minutos em cada paciente. Os insetos foram alojados em caixas apropriadas e as mesmas fixadas nos antebraços dos pacientes. Após um período de 28 dias de repouso foi realizada uma emulsão (*pool*) do trato gastrointestinal das ninfas e em seguida esse material foi examinado por microscopia para a presença de *T. cruzi*. Em determinados casos (dois pacientes) alguns indivíduos reportaram alergia a picada de insetos, com isso, foi retirado 4 mL de sangue venoso [recolhido por meio de um outro tubo para coleta de sangue a vácuo com EDTA (BD Vacutainer®)] e o conteúdo inserido em um preservativo masculino sem aditivos. E, posteriormente, colocado na presença de ninfas para o repasto sanguíneo. O restante do procedimento foi idêntico ao do xenodiagnóstico *in vivo*.

4.7 Amostras de dejetos de triatomíneos

Após os 28 dias de repouso dos triatomíneos, o papel de filtro das caixinhas dos insetos foi recolhido para um tubo de polipropileno de 15 mL com fundo cônico, novo e autoclavado, e em seguida, guardados em refrigerador a 4°C até o procedimento de tratamento da amostra. Posteriormente, o papel de filtro foi cortado manualmente em pedaços menores que 10mm x 10mm de formato triangular, dentro de um funil 10cm x 10cm de papel de filtro autoclavado. Os pedaços foram colocados novamente em um tubo de 15 mL, adicionados 3,0 mL de água livre de DNase e RNase (INVITROGEN, Life Technologies-Grand Island, NY - USA), incubados por 15 minutos para hidratação do papel de filtro, agitados em agitador mecânico tipo vortex por 2 minutos e centrifugados por 15 minutos a 3.800 rpm. Em seguida, foi adicionado mais água às amostras até completar um volume de 7,5 mL, foram novamente deixadas em repouso por 15 minutos para hidratação do papel de filtro, agitadas em agitador mecânico tipo vortex, centrifugadas a 3.800 rpm por 15 minutos e, posteriormente, guardadas em refrigerador à 4°C até o procedimento de extração de DNA. Todo o procedimento de tratamento das amostras foi efetuado em câmara de fluxo laminar.

4.8 Sequências de DNA alvo e iniciadores específicos

Foram objetivados dois elementos repetitivos do DNA de *T. cruzi*: sequência repetitiva de 195 pb conhecida como DNA satélite (genômico) (nDNA - 100.000 a 120.000 cópias por genoma) e o elemento repetitivo de 330 pb conhecido como DNA mini-círculo (mitocondrial) (kDNA - 10.000 a 20.000 cópias por genoma). Estas duas seqüências repetitivas correspondem a, aproximadamente, 15% do DNA total do parasito, sendo importante alvo para diagnóstico da doença (BRENER *et al.*, 1992). Foram empregados os seguintes pares de iniciadores fabricados pela INVITROGEN: Diaz-7 (5'-CGCAAACAGATATTGACAGAG-3') (DIAZ *et al.*, 1992) / Diaz-8 (5'-TGTTACACACTGGACACCAA-3') (DIAZ; NUSSENZWEIG; GONZALEZ, 1992), para amplificação do fragmento de 195 pb do DNA nuclear e 121 (5'-AAATAATGTTACGGG[T/G]GAGATGCATGA-3') (STURM *et al.*, 1989) / 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3') (STURM *et al.*, 1989), para amplificação do fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto. Inicialmente, foi efetuada a ressuspensão dos iniciadores com a adição de água livre de DNase e RNase (INVITROGEN) para uma concentração de solução estoque a 500uM. Estes cálculos foram efetuados *in silico* (processamento computacional) segundo IDT - Integrated DNA Technologies Inc., no sítio <http://www.idtdna.com/home/home.aspx>. Por meio da ferramenta de cálculo de ressuspensão, no sítio <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/resuspensioncalc/>. Posteriormente, foram produzidas as soluções de trabalho para uma concentração final de 20 pmol em um volume de 50 uL. Os cálculos foram efetuados por meio da ferramenta de cálculo de diluição, no sítio <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/DilutionCalc/>. Em seguida, a análise *in silico* dos iniciadores foi efetuada pela ferramenta de análise de oligonucleotídeos, no sítio <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. A análise *in silico* do alinhamento dos iniciadores com seqüências de nucleotídeos de bancos de dados *on line* foi efetuada pela ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no sítio <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Esta ferramenta é integrada ao NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) no sítio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Os resultados dos alinhamentos constam nos APÊNDICES X a AA. Os procedimentos de ressuspensão e diluição foram efetuados em câmara de fluxo laminar.

4.9 Extração de DNA total de amostra de sangue periférico

Foi recolhida uma alíquota de 500 µL da solução de sangue total + 6M Guanidina / HCl + 0,2M EDTA, pH 8,0 e incubados a 100°C por 10 minutos (BRITTO *et al.*, 1993). Em seguida, foi adicionado 500 µL de solução de tampão de lise para sangue humano com 10 mM TRIS-BASE, pH 8,0 (SIGMA – St. Louis, MO - USA), 10 mM EDTA, pH 8,0 (BIO-RAD), 100 mM NaCl (EM SCIENCE – New Jersey - USA), 1% SDS (J. T. Backer Inc – Philipsburg, NJ - USA), 3M Acetato de Sódio (VETEC – Rio de Janeiro - Brasil) e 1,0 µL de Proteinase K (20 mg/µL; Promega – Madison, W - USA). Em seguida, as amostras foram incubadas a 55°C por 2 horas sob agitação mecânica. A extração de DNA total (DNA humano, nDNA de *T. cruzi* e kDNA de *T. cruzi*) foi realizada segundo adaptação de Wincker *et al.* (1994) com Fenol, pH 8,0 (GIBCO-BRL – Grand Island, NY - USA) seguido de Clorofórmio P.A (Cromoline – São Paulo, SP - Brasil), precipitação por 3M Acetato de Sódio, pH 7,0 – 8,0 (VETEC) e Etanol P.A (VETEC) a -80°C por 30 minutos. Em seguida, o precipitado foi ressuscitado em solução de T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) e submetido a banho-maria a 68°C por 20 minutos. Ao final, a amostra foi guardada a -80°C até utilização para a PCR-Multiplex. Foram efetuadas duas extrações de DNA total de sangue. A primeira com ressuspensão em 200 µL de T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (APÊNDICE B) que apresentou baixa concentração. Com a alteração do protocolo foi efetuada uma segunda extração e o DNA total ressuscitado em 50 µL de T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (APÊNDICE D) que resultou em uma concentração da solução de DNA, na maioria das amostras, superior aos valores da primeira extração. Todas as amostras foram submetidas a dois procedimentos de extração de material genético, onde no primeiro ocorreu diluição em 200 µL de T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) e no segundo em 50 µL de T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0).

4.10 Extração de DNA total de amostra de solução de dejetos de triatomíneos

Foi recolhida uma alíquota de 500 µL da solução de dejetos de triatomíneos e incubados a 100°C por 10 minutos (BRITTO *et al.*, 1993). Em seguida, foi adicionado 500 µL de solução de tampão de lise para dejetos de triatomíneos com 10 mM TRIS-BASE, pH 8,0 (SIGMA), 1 mM EDTA pH 8,0 (BIO-RAD), 150 mM NaCl (EM SCIENCE), 1% SDS (J. T. Backer) e 1,0 µL de Proteinase K (20 mg/µL; Promega). Em seguida foram incubadas a 55°C

por 2 horas sob agitação mecânica. A extração de DNA total (DNA humano, nDNA e kDNA de *T. cruzi*) foi realizada segundo adaptação de Wincker *et al.* (1994) com Fenol, pH 8,0 (GIBCO-BRL) seguido de Clorofórmio P.A (Cromoline), precipitação por 3M Acetato de Sódio, pH 7,0 – 8,0 (VETEC) e Etanol P.A (VETEC) a -80°C por 30 minutos. Por conseguinte, o precipitado foi ressuspendido em solução de T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0), em seguida, submetido a banho-maria a 68°C por 20 minutos. Ao final, a amostra foi guardada a -80°C até utilização para a PCR-Multiplex. Neste ensaio também foram efetuadas duas extrações de DNA total da solução de dejetos de triatomíneos, conforme descrito no subitem anterior (APÊNDICE C e APÊNDICE E). Todas as amostras foram submetidas a dois procedimentos de extração de material genético, onde no primeiro ocorreu diluição em 200 µL de T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) e no segundo em 50 µL de T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0).

4.11 Quantificação de ácido nucléico (DNA)

O procedimento de quantificação das amostras de DNA total (DNA humano, kDNA e nDNA de *T. cruzi*) foi efetuado no espectrofotômetro da linha NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc - Wilmington, DE - USA), utilizando software de gerenciamento (ND-1000 V3.7.1), gentilmente cedido para uso pela Profa. Dra. Cristiane Cunha, do Laboratório de Micobactérias do DPML/UFC. Ao final do procedimento, o software gerou uma tabela com todos os valores pertinentes da análise espectrofotométrica e um gráfico de curva do ponto do comprimento de onda em referência com a intensidade de absorbância (APÊNDICES B, C, D e E).

4.12 Reação em Cadeia da Polimerase

Foi calculada a quantidade de água livre de DNase e RNase (INVITROGEN) e de solução de DNA molde (solução de DNA total extraído de sangue + Guanidina/HCl + EDTA ou solução de DNA total extraído de dejetos de triatomíneos) para que a massa de DNA total adicionada a reação fosse de 950 ng (conforme evidenciado no APÊNDICE F). A administração de DNA total em excesso interferiu suprimindo a reação, conforme visualizado nos APÊNDICES G e H. Foi administrado um volume de 1,5 µL de cada um dos quatro iniciadores (conforme evidenciado no APÊNDICE I): 121 / 122 e Diaz-7 / Diaz-8, todos a 20

pmol. Foram empregados kits DreamTaq™ DNA Polymerase – EP0702 (Fermentas - Thermo Fisher Scientific Inc - USA). Cada reação ocorreu com 5 µL de 10X DreamTaq™ Buffer (KCl + (NH₄)₂SO₄ + MgCl₂), 3,0 µL de MgCl₂ a 20mM, 2,5U de DreamTaq™ DNA Polymerase (20mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM DTT; 0,1mM EDTA; 100mM KCl; 0,5% (v/v) Nonidet P40; 0,5% (v/v) Tween 20 e 50% (v/v) Glicerol) e 4,5 µL dNTP-MIX(10mM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas). A amostra foi finalizada para um volume total de 50 µL e colocada em microtubo de 200 µL. Os ciclos basearam-se em uma etapa a 94°C por 5 minutos, 40 repetições de: uma etapa a 94°C por 20 segundos, uma etapa a 58°C por 30 segundos, uma etapa a 72°C por 30 segundos e, ao final das repetições, uma etapa a 72°C por 15 minutos. Todas as reações foram efetuadas no termociclador Mastercycler 5332 (Eppendorf – Hamburgo, Alemanha) e, ao final do processo, conservadas a 4°C. Todo o procedimento foi efetuado em câmara de fluxo laminar.

4.13 Eletroforese

O gel de agarose foi preparado a 1,5% (BIO-RAD) com 60 mL de solução de T.B.E (1/10) (Tris-Base/Ácido Bórico/EDTA), colocado a 65°C em forma acrílica e adicionado solução de T.B.E (1/10). Para um procedimento de eletroforese foi colocado dois géis moldados para efetuar o ensaio. Foi recolhido uma alíquota de 20 uL de solução de DNA proveniente da PCR e misturados com 4 uL de solução de Azul de Bromofenol (SIGMA). Utilizou-se marcador molecular de 100 pb (DNA ladder) (Fermentas) em cada extremidade do gel. Cada corrida eletroforética foi submetida a uma voltagem de 117 volts por um tempo de 45 minutos. Ao final do procedimento eletroforético, os géis foram submetidos à coloração por Brometo de etídio a 1mg/mL (SIGMA). Após 15 minutos de incubação, os géis foram colocados no transluminador UVC-20 (ULTRA LUM – Claremont-CA, USA) sob UV de 365 nm. A fotodocumentação foi feita com uma máquina fotográfica NIKON D5100 em modo monocromático e resolução máxima (16MP).

4.14 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada empregando o programa Excel 2007 para a construção de um banco de dados com os dados demográficos, epidemiológicos, parasitológicos, sorológicos e testes de biologia molecular. Na comparação das variáveis

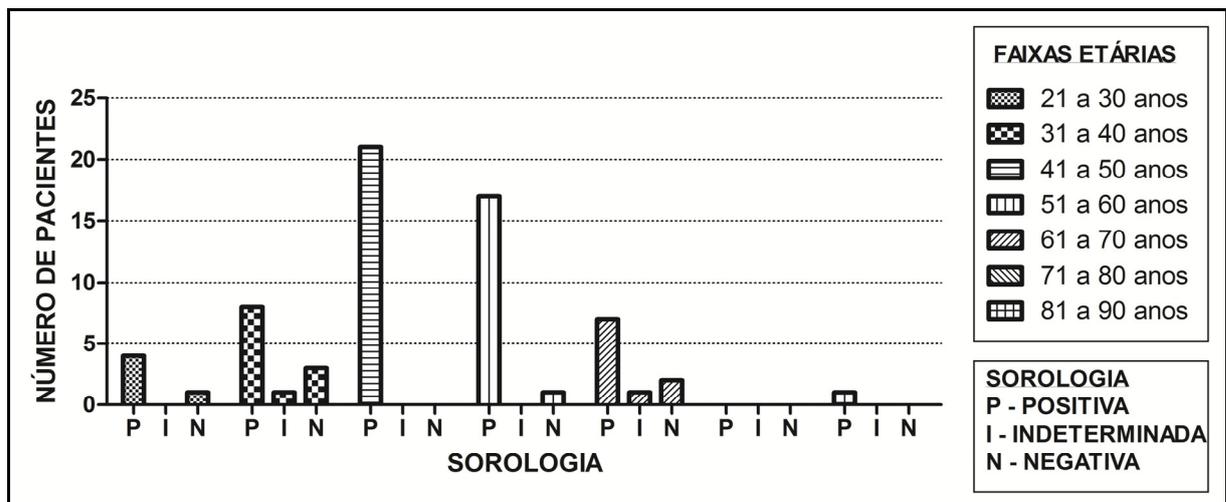
categóricas realizou-se análise univariada, utilizando-se o teste exato de Fischer, considerando-se o nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Dados demográficos e epidemiológicos

Dentre os 67 pacientes incluídos no estudo, 36 (53,73%) eram do sexo masculino e 31 (46,27%) do sexo feminino. Os pacientes do estudo exibiram um intervalo de idade entre 26 e 83 anos. Este amplo espectro foi dividido em 7 faixas etárias, onde a faixa etária de 21 a 30 anos apresentou 5 (7,46%) pacientes com mediana igual a 27 anos, de 31 a 40 anos apresentou 12 (17,91%) com mediana igual a 37 anos, de 41 a 50 anos apresentou 21 (31,34%) com mediana igual a 44 anos, de 51 a 60 anos apresentou 18 (26,86%) com mediana igual a 57 anos, de 61 a 70 anos apresentou 10 (14,92%) com mediana igual a 64,5 anos, de 71 a 80 anos apresentou valor nulo e sem valor de mediana e de 81 a 90 anos apresentou 1 (1,51%) paciente e sem valor de mediana (Fig. 10). Os dados epidemiológicos constam no APÊNDICE J.

Figura 10 – Faixas etárias (em anos) dos pacientes com Doença de Chagas crônica

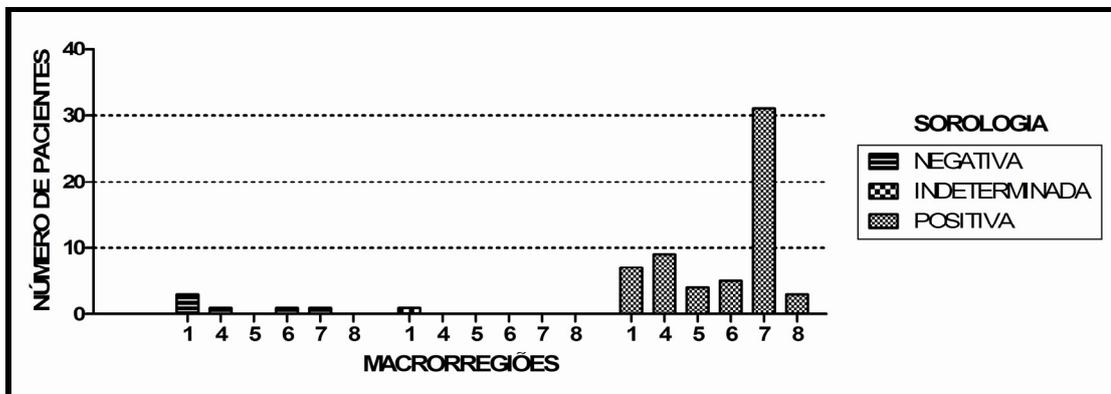


Tipologia sorológica (P - Positiva, I - Indeterminada e N - Negativa) dentro da cada grupo de faixa etária (21 a 30 anos, 31 a 40 anos, 41 a 50 anos, 51 a 60 anos, 61 a 70 anos, 71 a 80 anos e 81 a 90 anos) *versus* número de pacientes.

Todos os pacientes incluídos no estudo foram analisados em função da procedência declarada na hora do registro para a execução dos ensaios sorológicos e do xenodiagnóstico. O mapa tomado como referência foi o de Macrorregiões de Planejamento do Estado do Ceará, ano de 2011, produzido pelo IPECE – Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Estado do Ceará (ANEXO B). Todas as Macrorregiões em questão apresentam praticamente o mesmo Tipo Climático (exceto as Macrorregiões Baturité e Região Metropolitana de Fortaleza), no caso, Tropical Quente Semi-Árido, segundo IPECE, 2011.

Entre os pacientes com sorologia positiva para Chagas ($n = 59$), 7 (11,86%) foram provenientes ou afirmaram origem da Macrorregião 1 (Região Metropolitana de Fortaleza), 9 (15,25%) foram provenientes ou afirmaram origem da Macrorregião 4 (Sertão dos Inhamuns), 4 (6,77%) foram provenientes ou afirmaram origem da Macrorregião 5 (Sertão Central), 5 (8,47%) foram provenientes ou afirmaram origem da Macrorregião 6 (Baturité), 31 (52,54%) foram provenientes ou afirmaram origem da Macrorregião 7 (Litoral Leste / Jaguaribe) e 3 (5,11%) foram provenientes ou afirmaram origem da Macrorregião 8 (Cariri / Centro Sul). Entre os pacientes com sorologia indeterminada para Chagas ($n = 2$), todos foram provenientes ou afirmaram origem da Macrorregião 1 (Região Metropolitana de Fortaleza). Entre os pacientes com sorologia negativa para Chagas ($n = 6$), 3 (50,0%) foram provenientes ou afirmaram origem da Macrorregião 1 (Região Metropolitana de Fortaleza), 1 (16,66%) foi proveniente ou afirmou origem da Macrorregião 4 (Sertão dos Inhamuns), 1 (16,66%) foi proveniente ou afirmou origem da Macrorregião 6 (Baturité) e 1 (16,66%) foi proveniente ou afirmou origem da Macrorregião 7 (Litoral Leste / Jaguaribe) (Fig. 11).

Figura 11 – Gráfico das Macrorregiões x Número de pacientes



Procedência dos pacientes selecionados em relação às Macrorregiões do Estado do Ceará (Macrorregião 1 – Região metropolitana de Fortaleza, Macrorregião 4 – Sertão dos Inhamuns, Macrorregião 5 – Sertão Central, Macrorregião 6 – Baturité, Macrorregião 7 – Litoral Leste / Jaguaribe e Macrorregião 8 – Cariri / Centro Sul) correlacionando com a sorologia (POSITIVA, INDETERMINADA ou NEGATIVA).

5.2 Tipologia sorológica

Amostras biológicas (soro) dos 67 pacientes selecionados para o estudo, 59 (88,0%) tiveram positividade sorológica para Chagas, 2 (3,0%) tiveram sorologia indeterminada e 6 (9,0%) tiveram negatividade sorológica para Chagas (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de amostras versus Sorologia (ELISA, IFI HAI).

| Nº total de Amostras | Sorologia (ELISA, IFI, HAI) N (%) |
|----------------------|--------------------------------------|
| | 67 |

As notações para Sorologia representam, respectivamente, as seguintes definições: (+++ / ++-) Sorologia positiva para Chagas; (+--) Sorologia indeterminada para Chagas; e (---) Sorologia negativa para Chagas. Quantidades e respectivas porcentagens das 67 amostras biológicas com três ou dois testes sorológicos positivos (amostras com sorologia positiva para Chagas), um teste sorológico positivo (amostras com sorologia indeterminada para Chagas) e com três testes sorológicos negativos (amostras com sorologia negativa para Chagas).

5.3 PCR-Multiplex para sangue periférico (metodologia *in house*) comparada com o xenodiagnóstico e a sorologia

Entre os 59 pacientes sorologicamente positivos foi obtido um índice de 1,7% (1 resultado) positividade do exame de xenodiagnóstico feito por microscopia (Tabela 2). Entre as 59 amostras sorologicamente positivas para Chagas, 18 foram positivas para a PCR (30,5%) de amostras de DNA de sangue e 41 foram negativas (69,5%). Entre os 2 indivíduos com sorologia indeterminada para Chagas, nenhum foi positivo na PCR. As amostras com sorologia negativa para Chagas (n=6) apresentaram negatividade no xenodiagnóstico e um índice de positividade na PCR em amostras de sangue de 33,3% (2/6). Nestas mesmas amostras, o índice de positividade na PCR para amostras de DNA de solução de dejetos foi nulo (Tabela 2).

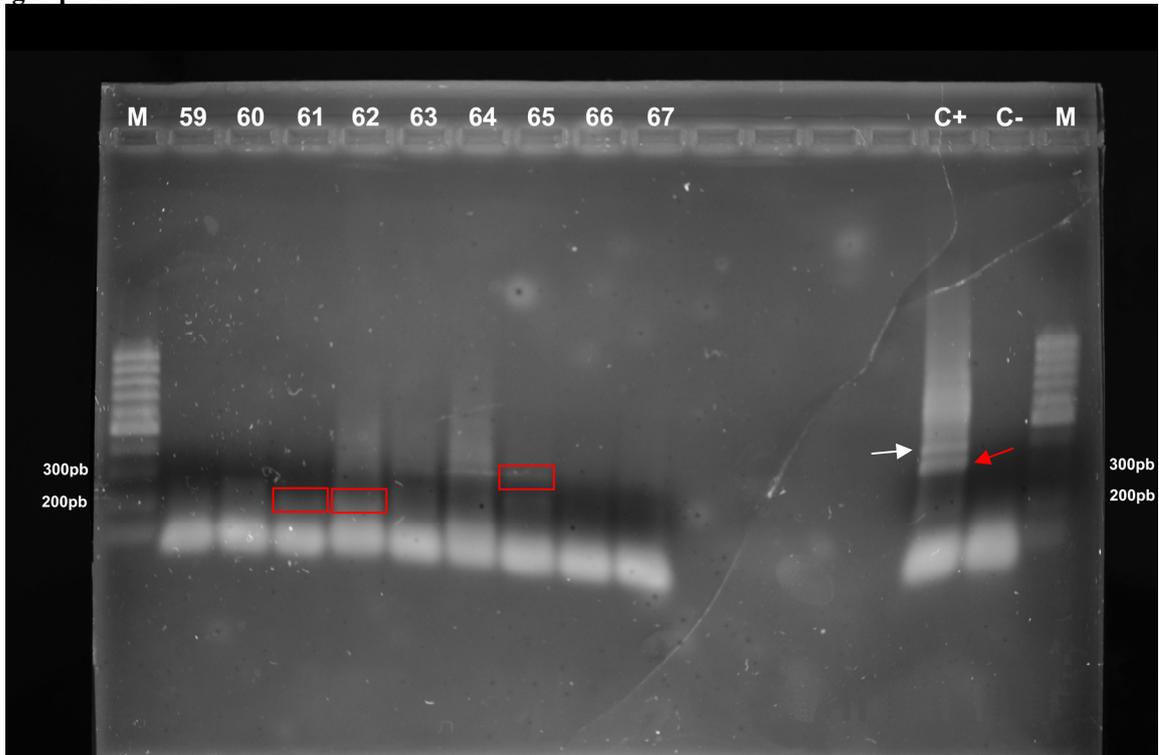
Tabela 2 – Número total de amostras versus Sorologia versus Xenodiagnóstico versus PCR-S (*in house*).

| Nº total de Amostras | Sorologia (ELISA, IF, HI) | Xenodiagnóstico N (%) | PCR-S(<i>in house</i>) | |
|----------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| | | | Positivo N (%) | Negativo N (%) |
| 67 | 59 (+++ / ++-) | 1 (1,7) | 18 (30,5) | 41 (69,5) |
| | 2 (+--) | 0 | 0 | 2 (100) |
| | 6 (---) | 0 | 2 (33,3) | 4 (66,7) |

As notações representam: (+++ / ++-) Sorologia positiva para Chagas; (+--) Sorologia indeterminada para Chagas e (---) Sorologia negativa para Chagas. PCR-S(+) representa PCR realizados em sangue periférico. Pareamento dos resultados de sorologia, xenodiagnóstico, PCR-Multiplex para a mostras de DNA de sangue extraídas por metodologia *in house*.

5.3.1 Eletroforese de amostras de PCR-Multiplex de DNA total de sangue periférico (metodologia *in house*)

Figura 12 – Foto de gel de agarose a 1,5% evelado com Brometo de etídio (1mg/mL) para DNA total de sangue periférico.



Resultado de PCR-Multiplex, com iniciadores 121/122 (para amplificação do fragmento de 330pb do DNA do cinetoplasto) e DIAZ-7/DIAZ-8 (para amplificação do fragmento de 195pb do DNA nuclear), de amostras (59 a 67) de DNA molde extraídas de sangue + Guanidina/HCl + EDTA por metodologia *in house*. As amostras 61 e 62 apresentaram positividade na amplificação do fragmento de 195 pb do DNA nuclear. A amostra 65 apresentou positividade na amplificação do fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto. O controle positivo apresentou amplificação do fragmento de 330pb (seta cor vermelha) e 390 pb (seta cor branca) (neste caso, um múltiplo do fragmento de 195 pb do DNA nuclear). (M) marcador de 100 pb, (C+) controle positivo (DNA total de cultura de *T. cruzi*) e (C-) controle negativo (DNA total de cultura de *L. chagasi*). Análises espectrofotométricas constam nos APÊNDICES B, C, D e E.

5.4 PCR-Multiplex para solução de dejetos de triatomíneos (metodologia *in house*) comparada com o xenodiagnóstico e a sorologia

Entre as 59 amostras sorologicamente positivas para Chagas, 20 foram positivas para a PCR (33,9%) de amostras de DNA de dejetos e 39 foram negativas (66,1%). Entre os indivíduos com sorologia indeterminada e negativa para Chagas, nenhum foi positivo na PCR de amostras de DNA de dejetos de triatomíneos (Tabela 3).

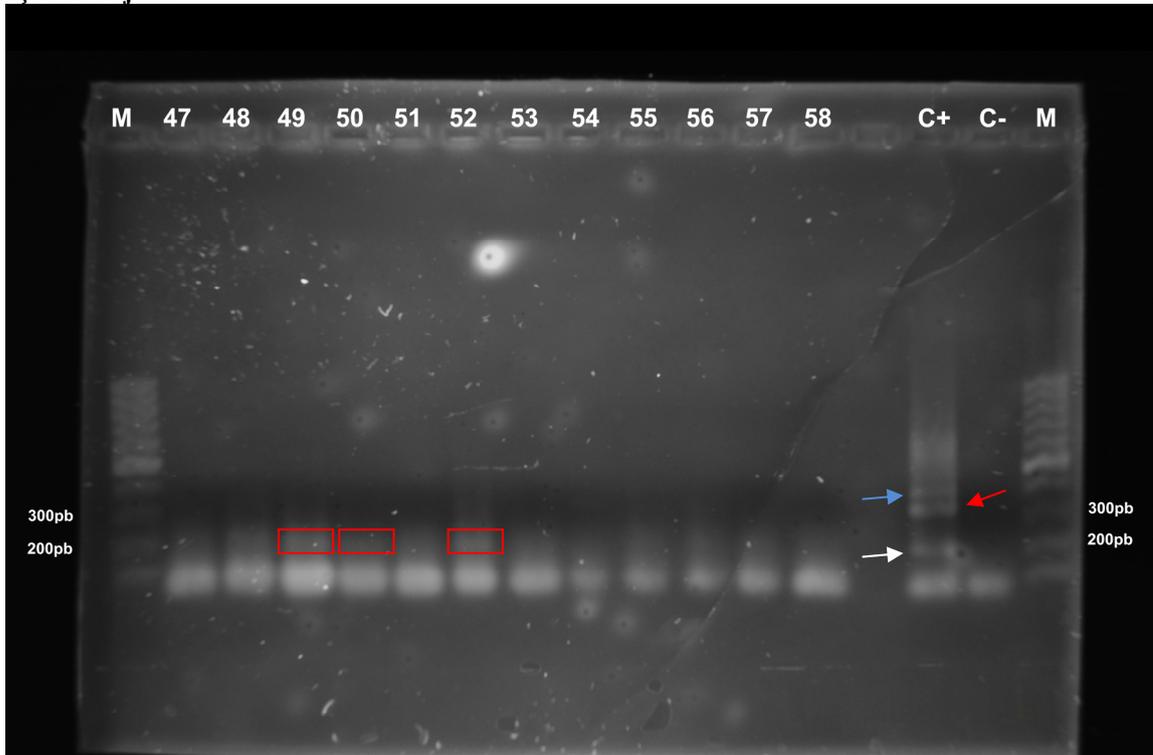
Tabela 3 – Número total de amostras versus Sorologia versus Xenodiagnóstico versus PCR-X (*in house*).

| Nº total de Amostras | Sorologia (ELISA, IF, HI) | Xenodiagnóstico N (%) | PCR-X (<i>in house</i>) | |
|----------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------|
| | | | Positivo N (%) | Negativo N (%) |
| 67 | 59 (+++ / ++-) | 1 (1,7) | 20 (33,9) | 39 (66,1) |
| | 2 (+--) | 0 | 0 | 2 (100) |
| | 6 (---) | 0 | 0 | 6 (100) |

As notações representam: (+++ / ++-) Sorologia positiva para Chagas; (+--) Sorologia indeterminada para Chagas e (---) Sorologia negativa para Chagas. PCR-S(+) representa PCR realizados nos dejetos dos triatomíneos que foram utilizados no teste de xenodiagnóstico. Pareamento dos resultados de sorologia, xenodiagnóstico, PCR-Multiplex para amostras de DNA de dejetos de triatomíneos extraídos por metodologia *in house*.

5.4.1 Eletroforese de amostras de PCR-Multiplex de DNA total de solução de dejetos (metodologia *in house*)

Figura 13 – Foto de gel de agarose a 1,5% revelado com Brometo de etídio (1mg/mL) para DNA total de solução de dejetos



Resultado de PCR-Multiplex, com iniciadores 121/122 (para amplificação do fragmento de 330pb do DNA do cinetoplasto) e DIAZ-7/DIAZ-8 (para amplificação do fragmento de 195pb do DNA nuclear), de amostras (59 a 67) de DNA molde extraídas de sangue + Guanidina/HCl + EDTA por metodologia *in house*. As amostras 49, 50 e 52 apresentaram positividade na amplificação do fragmento de 195 pb do DNA nuclear. O controle positivo apresentou amplificação do fragmento de 330pb (seta cor vermelha), amplificação do fragmento de 195 pb (seta cor branca) e um fragmento de 390 pb (seta cor azul) (neste caso, um múltiplo do fragmento de 195 pb do DNA nuclear). (M) – marcador de 100 pb, (C+) – controle positivo (DNA total de cultura de *T. cruzi*) e (C-) – controle negativo (DNA total de cultura de *L. chagasi*). Análises espectrofotométricas constam nos APÊNDICES B, C, D e E.

5.5 Comparação da PCR-Multiplex no sangue periférico e nos dejetos de triatomíneos com os testes sorológicos e o xenodiagnóstico

Dentre as amostras com sorologia positiva (n=59) foram obtidos 18 resultados positivos de PCR-Multiplex para sangue periférico e 41 resultados negativos. Nos PCR-Multiplex para dejetos de triatomíneos foram obtidos 20 resultados positivos e 39 resultados negativos. Dentre as amostras com sorologia indeterminada (n=2), foram obtidos apenas resultados negativos de PCR-Multiplex, tanto para sangue periférico como para os dejetos de triatomíneos. As amostras com sorologia negativa (n=6) apresentaram 2 resultados positivos de PCR-Multiplex para sangue e 4 resultados negativos. Para os dejetos de triatomíneos, as 6 amostras com sorologia negativa foram negativas na PCR-Multiplex (Tabela 4).

O único paciente que foi positivo no ensaio de xenodiagnóstico não apresentou positividade no PCR-Multiplex na amostra de sangue periférico, entretanto, os dejetos dos triatomíneos do xenodiagnóstico realizado neste paciente, mostraram resultado positivo no PCR-Multiplex. Dentre as amostras que foram negativas no ensaio de xenodiagnóstico (n=66), foram obtidos 20 resultados positivos de PCR-Multiplex para sangue periférico e 46 resultados negativos. Nos dejetos de triatomíneos, foram obtidos 19 resultados positivos de PCR-Multiplex e 47 resultados negativos (Tabela 4).

Tabela 4 – Ensaio realizado versus Número de amostras versus PCR (Sangue) versus PCR (Dejetos).

| Ensaio realizado | Nº de amostras N (%) | PCR(Sangue) | | PCR(Dejetos) | |
|------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Positivo N (%) | Negativo N (%) | Positivo N (%) | Negativo N (%) |
| Sorológicos | | | | | |
| Positivo | 59 (88) | 18 (30,5) | 41 (69,5) | 20 (33,8) | 39 (66,2) |
| Indeterminado | 2 (3) | 0 | 2 (100) | 0 | 2 (100) |
| Negativo | 6 (9) | 2 (30) | 4 (70) | 0 | 6 (100) |
| Xenodiagnóstico | | | | | |
| Positivo | 1 (2) | 0 | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Negativo | 66 (98) | 20 (30,3) | 46 (69,7) | 19 (28,8) | 47 (71,2) |

Teste de Fischer: $p = 0,4872$; PCR(+) (Sangue) x PCR(+) (Dejetos). Comparação dos resultados de PCR-Multiplex (iniciadores 121/122 para amplificação do fragmento de 330pb do DNA cinetoplasto e iniciadores DIAZ-7/DIAZ-8 para amplificação do fragmento de 195 pb do DNA nuclear) com os testes sorológicos e xenodiagnóstico.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi encontrado que, dos 67 pacientes selecionados para o estudo, 36 (53,73%) foram do sexo masculino e 31 (46,27%) do sexo feminino. Estes dados indicam que a prevalência da doença de Chagas crônica é semelhante em relação aos dois sexos, corroborando com trabalhos anteriores (LARANJA *et al.*, 1956; BORGES-PEREIRA *et al.*, 2008).

A faixa etária que mais foi atingida pela doença foi a de 41 a 50 anos apresentando 21 (31,34%) pacientes. A segunda faixa etária mais atingida foi a de 51 a 60 anos apresentando 18 (26,86%) pacientes. Tais dados já eram esperados, uma vez que os participantes do estudo eram portadores de doença de Chagas crônica e a fase crônica da doença acomete mais pessoas adultas, justamente nestas faixas etárias, como também foi visto em outro trabalho (LARANJA *et al.*, 1956).

Os dados deste trabalho mostraram que a maioria dos municípios inseridos nas macrorregiões (ANEXO B) que apresentaram a maior parte dos casos de soropositividade para a doença de Chagas também estão inseridos nas áreas de risco de infecção por *T. cruzi* (CEARÁ, 2008) (ANEXO C). Estes mesmos municípios, segundo o IPECE em seu relatório de 2008 (apresentado em 2011) sobre o Índice de Desenvolvimento Municipal, apresentaram indicadores econômicos e sociais baixos, onde do total de 184 municípios do Estado do Ceará, apenas 20 possuem indicadores econômicos e sociais satisfatórios, sendo 10 municípios pertencentes à Região Metropolitana de Fortaleza. Os demais 164 municípios apresentam indicadores baixos e concentram quase a metade da população do Estado do Ceará (IPECE, 2011). Tais dados mostram que a prevalência da doença de Chagas é preponderante na população menos favorecida em termos econômicos e sociais, o que já era mostrado em trabalhos mais antigos (MARSDEN; CROLL; CROSS, 1983; VALENCIA, 1990; DIAS, 1993).

Segundo os dados de 2008 da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (ANEXO C), pareados com os dados do corrente trabalho, apenas quatro municípios (Jaguaratama, Russas, Palhano, Jaguaruana e Quixeré) pertencentes à Macrorregião Litoral Leste / Jaguaribe foram consideradas áreas de risco para infecção por *T. cruzi*. Os dados deste trabalho revelam que também ocorreram casos de doença de Chagas nos municípios de Limoeiro do Norte, Morada Nova, Tabuleiro do Norte e Itaiçaba, sugerindo que regiões que antes não eram consideradas endêmicas estão mudando seu perfil ao longo dos anos.

Os estudos de Borges-Pereira *et al.* (2008), realizados em Jaguaruana/CE, não mostraram diferença na prevalência da infecção em relação ao sexo e apresentaram soropositividade crescente com a idade. Também resultou na confirmação que a região do Baixo Jaguaribe (Macrorregião Litoral Leste / Jaguaribe) está entre as áreas com maiores índices de infecção do Estado do Ceará. Dentre as 17 pessoas soropositivas estudadas no referido trabalho, quando submetidas ao xenodiagnóstico indireto, resultou em positividade para 2 (11,8%) exames e o ensaio de PCR para sangue de 12 pessoas (não informado o motivo da não execução dos outros 5) mostrou positividade para 9 (75%) exames (BORGES-PEREIRA *et al.*, 2008).

O ensaio sorológico em diferentes infecções pode apresentar reações cruzadas que podem originar resultados falso-positivos quando, na maioria das vezes, se emprega antígenos não-processados (brutos). Em relação à doença de Chagas, a reação cruzada mais comum se dá com leishmaniose visceral (CAMARGO *et al.*, 1991; ANDRADE; ANDRADE; WRIGHT, 1988; CHIARAMONTE *et al.*, 1996). Os ensaios sorológicos convencionais (HAI, IFI e ELISA), na maioria das vezes, apresentam títulos com valores altos. Uma forma de efetuar diferenciação entre leishmaniose visceral e doença de Chagas é empregando o diagnóstico clínico, onde na doença de Chagas crônica, geralmente, o paciente não apresenta sinais clínicos visíveis. Diferentemente, na leishmaniose visceral, o paciente apresenta-se com indicativos clínicos, tais como febre, hepatoesplenomegalia, entre outros (MALCHIODI *et al.*, 1994). A detecção do *T. cruzi* via testes sorológicos convencionais pode apresentar reação cruzada também com o *T. rangeli*. O sistema imunológico do indivíduo infectado elimina o parasito e, conseqüentemente, produz anticorpos de memória que podem fornecer os resultados falso-positivos encontrados nos ensaios sorológicos convencionais (HUDSON *et al.*, 1987; VASQUEZ *et al.*, 1997). Outro elemento, pouco conhecido e não menos importante, que também interfere no correto diagnóstico sorológico da doença de Chagas é o fator reumatóide. São anticorpos IgM anti-IgG, originados de doenças auto-imunes, notadamente, em pessoas idosas (que podem, aparentemente, estar sadios) (CABRAL, 1982).

Em suma, os ensaios sorológicos convencionais apresentam uma alta sensibilidade, porém com baixa especificidade (SCHMUNIS, 1991; AVILA *et al.*, 1993; GOMES *et al.*, 1999; PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003). O teste da PCR tem sido sugerido, portanto, como uma alternativa, por ser um teste que apresenta alta especificidade, podendo ser utilizado como método confirmatório no diagnóstico de pacientes com provas sorológicas duvidosas na doença de Chagas crônica em comparação às técnicas sorológicas e

parasitológicas. Há estudos em pacientes com doença de Chagas que mostram que a PCR é um teste que apresenta elevada especificidade e sensibilidade, podendo apresentar diferentes taxas de detecção em diferentes materiais de análise, por exemplo: sangue, soro, dejetos de triatomíneos ou emulsão de intestinos de triatomíneos (GOMES, 1993; RUSSOMANDO, 1992; ZULANTAY, 2007)

Em trabalhos de Russomando *et al.* (1992), empregando o ensaio da PCR em material de soro de 12 pacientes chagásicos crônicos, com os iniciadores para amplificação de 188 pb do DNA nuclear (região interior ao fragmento de 195 pb), foram obtidos resultados positivos de PCR convencional nas 12 amostras de soro testadas. Nos estudos de Avila *et al.* (1993) também foi utilizado o ensaio da PCR em amostras de sangue total adicionados de 3M Guanidina/HCl + 0,1M EDTA. A extração do material genético empregou purificação por fenol e clorofórmio. A região de interesse compreendia o fragmento de 330 pb do DNA minicírculo (kDNA). As amplificações apresentaram múltiplos de 330 pb (no caso, 660 pb e 990 pb), pois este fragmento apresenta-se em cópias com sítios de origem de replicação compreendidos em 4 setores de 12 pb (GUHL *et al.*, 2002). Avila *et al.* (1993) obtiveram sensibilidade de 98,96% em relação aos ensaios sorológicos (HAI, IFI, ELISA e fixação de complemento) e 100% na PCR adicionada à hibridização em membrana de nylon. Na ocorrência da não visualização do fragmento de interesse, via gel de agarose corado com EtBr, o emprego da hibridização revela bandas cuja intensidade não é percebida via transluminação com EtBr.

No presente trabalho, entre os resultados sorológicos positivos (n=59) foram obtidos 18 (30,50%) resultados positivos na PCR-Multiplex realizados em sangue periférico de pacientes chagásicos crônicos. Há estudos que obtiveram 3,8% de positividade na PCR convencional (empregando iniciadores para o fragmento de 188 pb) em sangue (RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 1999). No mesmo trabalho os autores obtiveram 4,5% de positividade na PCR (agora empregando iniciadores para o fragmento de 330 pb) em sangue. Este trabalho foi realizado com pacientes chagásicos crônicos e não foi revelado o volume de sangue usado para a extração de DNA. Em outros estudos, os autores obtiveram 83,5% de positividade na PCR convencional (empregando os iniciadores 121/122 para amplificar o fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto) com DNA extraído de um volume de 15 mL de sangue (provenientes de 200 mL) de paciente chagásicos crônicos (GOMES *et al.*, 1999).

O presente estudo obteve uma taxa de positividade de 1,69% para o xenodiagnóstico, isto considerando 1 ensaio de xenodiagnóstico positivo dentro da categoria de pacientes com

sorologia positiva para Chagas (n=59). Foram empregadas 40 ninfas de *Rodnius prolixus* de 3º estágio com tempo de 30 minutos para o repasto sanguíneo, segundo adaptações de estudos anteriores (CERISOLA *et al.*, 1975). O ensaio foi efetuado com a análise da emulsão (*pool*) do trato intestinal depois de decorridos 28 dias de incubação e os dejetos foram direcionados para a análise via PCR. O único resultado positivo de xenodiagnóstico deste trabalho ocorreu em um paciente chagásico crônico que teve hanseníase e foi medicado com imunossupressores 3 meses antes de participar do estudo. Vale salientar que o mesmo paciente já tinha feito exames anos anteriores e foi considerado como portador de doença de Chagas crônica, a época. Tal resultado evidencia que o ensaio de xenodiagnóstico em pacientes chagásicos crônicos do Ceará apresenta baixos índices de positividade, quando averiguado pela microscopia óptica (M.O). Por outro lado, quando aplicado o ensaio da PCR com material proveniente do xenodiagnóstico, o índice de positividade atinge 33,89% (20 resultados positivos de PCR-Multiplex em dejetos de triatomíneos) de positividade. Salientando que foi aplicado o ensaio de PCR-Multiplex sem auxílio de hibridização *in situ*, apenas com emprego de eletroforese com gel de agarose e com fotodocumentação de gel corado com EtBr.

Em outros trabalhos também foi empregado o ensaio de xenodiagnóstico com 40 ninfas de 4º estágio, entretanto eram 20 ninfas de *Triatoma infestans* e 20 ninfas de *Panstrongylus megistus*, para cada teste (um teste por paciente). O repasto sanguíneo teve duração de 30 minutos e, ao final deste, os dejetos foram examinados com 45 dias por M.O, para a detecção de *T. cruzi*. A avaliação dos dados mostrou que, de um total de 83 pacientes chagásicos crônicos, ocorreram 48 exames positivos (54%) (AVILA *et al.*, 1993). O que mostra que quanto maior o tempo de incubação maior a probabilidade de detectar o *T. cruzi*.

Outros trabalhos utilizaram coletas dos dejetos em papel de filtro com periodicidade de 1, 2, 4 e 12 semanas e colocaram os mesmos a 25°C e coleta paralela a cada 4 semanas e o material foi colocado a 40°C (HAMANO *et al.*, 2001). No primeiro caso simulavam-se as condições naturais e no segundo, as condições artificiais de alojamento dos dejetos. O trabalho mostrou que em condições naturais o kDNA do parasito sofre degradação em função da presença de microorganismos no suporte (ambiente) dos dejetos (HAMANO *et al.*, 2001). A aplicação desta metodologia direcionada ao exame de xenodiagnóstico de rotina torna-se inviável, uma vez que o paciente tem um tempo muito longo (até 3 meses) para receber o resultado do ensaio. Outros estudos empregando símios infectados com *T. cruzi* obtiveram 26% de positividade no ensaio de xenodiagnóstico. Os insetos eram transferidos para novos recipientes, separados uns dos outros a cada 48 h e averiguados com periodicidade de 6, 16,

26 e 43 dias após o repasto sanguíneo, onde no 43^o dia era realizado cultura para averiguação após 20 dias (RUSSOMANDO *et al.*, 1996).

O presente trabalho obteve 20 (33,89%) resultados positivos na PCR-Multiplex realizados com dejetos de triatomíneos, isto dentro da categoria de pacientes sorologicamente positivos para doença de Chagas crônica (n=59). Há trabalhos onde se obteve 80% de positividade na PCR convencional (empregando os iniciadores para fragmento de 188 pb) e de 84% de positividade quando associada ao ensaio de hibridização *in situ* (Southern blot) (RUSSOMANDO *et al.*, 1996). Os estudos de Zulantay *et al.* (2007), trabalhando com pacientes chagásicos crônicos, obtiveram 40% de positividade no xenodiagnóstico com 30 dias de incubação e 92% de positividade na PCR convencional (empregando iniciadores para o fragmento de 330 pb), também com 30 dias, com os dejetos de *Triatoma infestans*. Em outro momento (ainda no mesmo trabalho) foi encontrado 80% de positividade no xenodiagnóstico com 90 dias de incubação e 96% de positividade na PCR (empregando iniciadores para o fragmento de 330 pb), também com 90 dias, com os dejetos de *Triatoma infestans*. Tais dados sugerem que o PCR dos dejetos de triatomíneos é mais sensível que o teste do xenodiagnóstico. Fato este também encontrado nos resultados do corrente trabalho, onde foram obtidos 20 (n=59) resultados positivos na PCR-Multiplex em dejetos de triatomíneos e apenas 1 xenodiagnóstico positivo.

É importante salientar que a PCR-Multiplex em dejetos de triatomíneos pode ser um teste complementar a PCR-Multiplex em sangue periférico, pois quando um não apresenta positividade o outro apresenta. Nos dados do presente trabalho, das 20 amostras que foram positivas na PCR, apenas 6 foram positivas em amostras de sangue e de dejetos.

Em trabalhos de Lent e Valderrama (1977) foram observados que ninfas de *Rhodnius prolixus* podem ingerir até 226,79 mg (por cada ninfa) de sangue de camundongo. Considerando o valor da densidade do sangue de camundongos igual a 1002 mg/mL (1,002 g/cm³), e o valor de sangue de camundongo ingerido por ninfa igual a 150 mg (valor subestimado) resulta em um volume de 149,97 µL ingerido por cada ninfa (YEN *et al.*, 2011). Tomando este valor para as 40 ninfas empregadas no xenodiagnóstico resulta em 5,99 mL (aproximadamente, 6,0mL) de sangue total ingerido pelas ninfas. Este volume é superior ao volume total recolhido por tubo a vácuo (\pm 4,0mL) e isto, certamente, influencia na quantidade de DNA total extraído dos dejetos dos triatomíneos e, conseqüentemente, na detecção do material genético de *T. cruzi*.

Conforme Schijman *et al.* (2011), a sensibilidade e especificidade do ensaio da PCR depende de alguns fatores técnicos, tais como, o volume de amostra recolhida, condições de conservação das amostras, método de extração de DNA, sequências de iniciadores e regiões alvo, grau dos reagentes e condições de termociclagem. Certamente, os índices de detecção da PCR-Multiplex para sangue periférico e para dejetos de triatomíneos encontrados no presente trabalho poderiam ter sido maiores, se não ocorressem limitações nesta metodologia. Isto ficou evidente quando foram comparados os resultados da PCR-Multiplex em sangue periférico (DNA extraído por metodologia Fenol / Cloroformio) com a PCR convencional da mesma amostra de sangue periférico (DNA extraído por kit comercial de extração de DNA) em um estudo piloto efetuado anteriormente à padronização da PCR-Multiplex com 37 pacientes com Chagas crônica, descrito nos APÊNDICES L ao V. Neste estudo piloto, a PCR convencional apresentou 10 (90,91%) resultados positivos em sangue periférico de pacientes com alta positividade sorológica para Chagas (títulos sorológicos altos), 11 (78,57%) resultados positivos em sangue periférico de pacientes com baixa positividade sorológica para Chagas (títulos sorológicos baixos) e 12 (100%) resultados positivos em sangue periférico de pacientes com negatividade sorológica para Chagas. O intuito do estudo piloto foi verificar o quanto de DNA poderia ser extraído e se esta quantidade seria suficiente para a detecção do material genético do *T. cruzi* por meio do ensaio de PCR, até então PCR-convencional, pois empregava somente um par de iniciadores para uma região. O fragmento de interesse representava a banda de 330 pb do kDNA. Onde, na maioria amostras, foram obtidos múltiplos do fragmento de 330 pb, sendo eles 660 pb, 990 pb e raras vezes 1320 pb, tal fato já relatado na literatura (AVILA *et al.*,1993; BRITTO *et al.*,1995; DEGRAVE *et al.*,1988; STURM *et al.*, 1989).

A metodologia de extração de DNA utilizando kit comercial emprega membranas de sílica que atuam como um funil seletivo em que uma substância ligante (tampão de ligação) ao DNA liga-se a uma porção de área útil da membrana. Em seguida, outra substância (tampão de eluição) efetua a eluição do DNA que foi capturado pela membrana de sílica. Ou seja, todo o material genético em um determinado volume a ser trabalhado (no caso 200 µL) é forçado a passar pela membrana de sílica e, possivelmente, todo o material genético em questão é isolado. Por esse motivo, o rendimento de um procedimento de extração de DNA por kit comercial apresenta rendimento superior quando comparado a extração *in house* empregando Fenol / Clorofórmio.

Recentemente, estudos de Schijman *et al.* (2011) mostraram que a metodologia de extração por kit obteve melhor resultado que a por solvente (*in house*). Em relação aos iniciadores, o iniciador para a região nuclear (neste caso, para o fragmento de 182 pb que fica dentro do fragmento de 195 pb do DNA nuclear) exibiu sensibilidade superior ao iniciador para o fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto. Já o iniciador para o fragmento de 330 pb exibiu sensibilidade superior ao iniciador para 182 pb. No presente trabalho também foi evidenciado que o iniciador para o fragmento de 330 pb exibe uma sensibilidade superior ao de 195 pb, conforme o APÊNDICE I, bem como, o iniciador para o fragmento de 195 pb exibiu ótima especificidade, fato este confirmado por não ter ocorrido amplificação inespecífica no controle negativo.

Ainda em relação ao estudo de Schijman *et al.* (2011), foi empregado ensaio da PCR convencional e Real Time – PCR, onde, os iniciadores atuaram em reações isoladas um do outro para amostras de DNA de *T. cruzi* (forma epimastigota) em água, amostra de sangue humano adicionado de DNA de *T. cruzi* (forma epimastigota) e amostra de sangue humano soropositivo para Chagas. Cada grupo tinha seu respectivo controle negativo. Ao final, a taxa de positividade do ensaio da PCR em relação às amostras soropositivas para Chagas, exibiu uma variação de 59,4 % a 100%. A sensibilidade resultou em taxas entre 60% e 65%, sempre com 100% de especificidade. Tais autores afirmaram que o ensaio da PCR para o diagnóstico da doença de Chagas crônica apresentou limitações, que podem ser suplantadas com as correções dos fatores limitantes apresentados anteriormente, dado que também conflui com os resultados mostrados no presente estudo.

Em suma, os dados apresentados neste trabalho mostram que o ensaio da PCR-Multiplex em amostras de sangue periférico, empregando iniciadores para regiões diferentes, no caso, DNA nuclear e DNA cinetoplasto, pode ser aplicado para o diagnóstico de doença de Chagas crônica, mesmo com diferentes metodologias de extração de DNA total. A PCR-Multiplex em dejetos de triatomíneos provenientes de xenodiagnóstico mostrou-se completar à PCR-Multiplex em amostras de sangue periférico. Caso os laboratórios de diagnóstico de doença de Chagas tenham infra-estrutura para realizar ensaios de biologia molecular, o ensaio da PCR-Multiplex em sangue periférico poderia ser acrescentado à rotina. Vale salientar que este é o primeiro trabalho utilizando a metodologia da PCR-Multiplex usando os iniciadores DIAZ-7/DIAZ-8 (para o fragmento de 195 pb, DNA nuclear) e os iniciadores 121/122 (para o fragmento de 330 pb, DNA cinetoplasto) para a detecção de material genômico de *T. cruzi* no sangue de pacientes com doença de Chagas crônica e em dejetos de triatomíneos.

Adicionalmente, o ensaio de xenodiagnóstico é laborioso (necessitando de manutenção do repasto das ninfas), demorado (depende do tempo de incubação), limitado (depende de uma única fonte de amostra, no caso, sangue humano) e passível de mais falhas (por exemplo, erro humano) quando comparado com o ensaio de PCR-Multiplex. Pois neste, mesmo sob risco de interferência de contaminação (quando não são seguidas as normas de Biossegurança), necessidade de empregar reagentes com grau de pureza para ensaios de biologia molecular e mão-de-obra qualificada, apresenta aplicabilidade em sangue e soro humano (APÊNDICE N). Além disso, a PCR pode ser auxiliada com um ensaio adicional, como a hibridização *in situ* (Southern blot), que pode exibir fragmentos amplificados quando não visualizados em gel de agarose com revelação de EtBr.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- O ensaio da PCR-Multiplex, padronizada para as regiões de 195pb do nDNA e de 330pb do kDNA, mostrou-se viável a partir da extração de material genético por metodologia *in house*;
- A PCR-Multiplex em DNA extraído de sangue periférico e em dejetos de triatomíneos provenientes do xenodiagnóstico mostrou aplicabilidade para uso no diagnóstico de pacientes com doença de Chagas crônica;
- A PCR-Multiplex em DNA extraído de dejetos de triatomíneos provenientes do xenodiagnóstico mostrou-se mais sensível do que o ensaio de xenodiagnóstico em pacientes com doença de Chagas crônica;
- A PCR-Multiplex em DNA extraído em dejetos de triatomíneos provenientes do xenodiagnóstico é completar à PCR-Multiplex em DNA extraído de sangue periférico.

8 RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se que o uso da PCR-Multiplex em DNA extraído, por metodologia *in house* (ou, preferivelmente, por kit comercial de extração) de sangue periférico, seja incluído na rotina do diagnóstico da doença de Chagas, acompanhado da sorologia convencional, e se possível adicionado à hibridização *in situ* (Southern Blot), caso o laboratório possua infraestrutura para realizar os ensaios de biologia molecular. Se o laboratório faz rotineiramente xenodiagnóstico, o uso da PCR-Multiplex em DNA extraído de dejetos de triatomíneos pode ser um teste completar.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, H. M.; ABAD-FRANCH, F.; DIAS, J. C. P.; JUMQUEIRA, A. C. V.; COURA, J. R. Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 47-55, 2007.
- ALENCAR, J. E. **História Natural da Doença de Chagas no Estado do Ceará**. 1. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária da UFC, 1987.
- ALMEIDA, C. E.; VINHAES, M. C.; ALMEIDA, J. R.; SILVEIRA, A. C.; COSTA, J. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p.761-768, 2000.
- ANDRADE, C. R.; ANDRADE, P. P.; WRIGHT, E. P. *Leishmania donovani* antigens recognized by kala-azar patient sera and identification of cross-reacting antigens to Chagas disease. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 21, p. 511-515, 1988.
- AVILA, H. A.; SIGMAN, D. S.; COHEN, L. M.; MILLIKAN, R. C.; SIMPSON, L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: Diagnosis of chronic Chagas disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 48, p. 211-222, 1991.
- AVILA, H. A.; PEREIRA, J. B.; THIEMANN, O.; DE PAIVA, E.; DI GRAVE, W.; MOREL, C. M.; 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p. 2421-2426, 1993.
- BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A. C.; OLIVEIRA, R. L. Tentativa de isolamento primário de *T. cruzi* de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura agentes bloqueadores. **Revista de Patologia Tropical**, v. 12, p. 155-163, 1983.
- BARRETO, A. C.; MARSDEN, P. D.; CUBA, C. C.; ALVARENGA, N. J. Estudo preliminar sobre o emprego de *Dipetalogaster maximus* (Uhler,1894) (Triatominae) na técnica do xenodiagnóstico em forma crônica da doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 20, p. 183-189, 1978.
- BILATE, A. M. B.; CUNHA-NETO, E.; Chagas disease cardiomyopathy: Current concepts of an old disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 67-74, 2008.
- BIOLO, A.; RIBEIRO, A. L.; CLAUSELL, N. Chagas Cardiomyopathy-Where Do We Stand After a Hundred Years? **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 52, p. 300-316, 2010.
- BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A. C.; SANTOS, L. C.; DE-CASTRO, J. A.; DE ARAÚJO, I. B.; COURA, J. R. Xenodiagnosis in chronic Chagas disease. I. The sensitivity of *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 341-377, 1996.

BORGES-PEREIRA, J.; SARQUIS, O.; ZAUZA, P. L.; BRITTO, C.; LIMA, M. M. Epidemiology of Chagas disease in four rural localities in Jaguaruana, State of Ceará. Seroprevalence of infection, parasitemia and clinical characteristics. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 345-351, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doença de Chagas: Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública**. Brasília, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Consenso brasileiro em doença de chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, 2005, p.11.

BRASIL. Ministério da Saúde. **História sobre a doença de Chagas no Brasil: O Inquérito de soroprevalência da infecção chagásica humana (1975-1980)**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **História sobre a doença de Chagas no Brasil: O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008)**. Brasília, 2011.

BRASIL, P. E. A. A.; CASTRO, L.; HASSLOCHER-MORENO, A.; SANGENIS, L. H. C.; BRAGA, J. U. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 337, 2010.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 205-212, 1987.

BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; RAVEL, C.; SANTORO, A.; PEREIRA, J. B.; COURA, J. R.; MOREL, C. M.; WINCKER, P. *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonreactive hybridization. **Experimental Parasitology**, v. 81, p. 462-471, 1995.

BRUMPT, E. Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, v.7, p.706-710, 1914.

BURGARELLI, M. K. N. Contribuição para o estudo clínico-laboratorial e imunológico da associação entre a doença de Chagas e a síndrome da imunodeficiência adquirida. **Revista de Patologia Tropical**, v. 25, p. 81-167, 1996.

CABRAL, H. R.; GLOCKER, T. M.; NOVALS, I. T.; KRAINBUHL, V. A. The esophagus in patients with Chagas disease in Cordoba, Argentina. Histologico-immunohistochemical, and evacuation time. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nacional de Cordoba**, v. 56, p. 27-33, 1999.

CABRAL, H. R. A. Rheumatoid factors and Chagas' disease. **Science**, v. 219, p. 1026, 1982.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 8, p. 227-234, 1966.

CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in immunofluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, p. 500-505, 1969.

CAMARGO, M. E.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; CORREA, N. S.; PERES, B. A. Hemagglutination test for Chagas' disease with chromium chloride, formalin-treated erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 13, p. 45-50, 1971.

CAMARGO, M. E.; WENDEL, S.; BRENER, Z.; RASSI, A. Serological diagnosis – An appraisal of Chagas disease serodiagnosis. Chagas disease (American Trypanosomiasis), its impact on Transfusion and Clinical Medicine. **Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Sao Paulo, p. 165-178, 1991.

CAVALCANTI, D. P.; SHIMADA, M. K.; PROBST, C. M.; SOUTO-PADRÓN, T. C. B. S.; SOUZA, W.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S. P.; MOTTA, M. C. M. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **BCM Microbiology**, v. 9, p. 1471, 2009.

CAVALCANTI, L. P. G.; ROLIM, D. B.; PIRES NETO, R. J.; VILAR, D. C. L. F.; NOGUEIRA, J. O. L.; POMPEU, M. M. L.; TEIXEIRA, M. J.; SOUSA, A. Q. Microepidemics of acute Chaga's disease by oral transmission in Ceará. **Caderno de Saúde Coletiva**, v.17, p. 911-921, 2009.

CARVALHO, M. R.; KRIEGER, M. A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W.; SHIKANAI-YASSUDA, M. A.; FERREIRA, A. W.; PEREIRA, J. B.; SAEZALQUEZAR, A.; DORLHIACLLACER, P. E.; CHAMONE, D. F.; GOLDENBERG, S. Chagas disease diagnosis: evolution of several test in blood bank screening. **Transfusion**, v. 33, p. 830-834, 1993.

CARRIAZO, C. S.; SEMBAJ, A.; AGUERRI, A. M.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C.; BÚA, J.; RUIZ, A.; SEGURA, E.; BARRAL, J. M. Polymerase Chain Reaction Procedure to Detect *Trypanosoma cruzi* in Blood Samples from Chronic Chagasic Patients. **Parasitology**, v. 30, p. 183-186, 1998.

CARVALHO, M. R.; KRIEGER, M. A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W.; SHIKANAI-YASSUDA, M. A.; FERREIRA, A. W.; PEREIRA, J. B.; SAEZ-ALQUEZAR, A.; DORLHIAC-LLACER, A.; CHAMONE, D. F.; GOLDENBERG, S. Chagas disease diagnosis: evolution of several test in blood bank screening. **Transfusion**, v. 33, p. 830-834, 1993.

CASTRO, C.; CRAIG, S. P.; CASTANEDA, M. Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 4, p. 273-282, 1981.

CASTRO, C. N.; ALVES, M. T.; MACEDO, V. O. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 16, p. 98-113, 1983.

CENTURION-LARA, A.; BARRRETT, L.; VOORHIS, W. C. V. Quantitation of parasitemia by competitive polymerase chain reaction amplification of parasite kDNA minicircles during chronic infection with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, p. 1334-1339, 1994.

CERISOLA, J. A.; ROHWEDDER, R.; SEGURA, E. L.; DEL PRADO, C. E.; ALVAREZ, M.; MARTINI, G. J. W. **El xenodiagnóstico**. [S.l.]: PAHO, 1975. Session III, B. 4.

CHIARAMONTE, M. G.; ZWIRNER, N. W.; CAROPRESI, S. L.; HEREDIA, V.; TARANTO, N. J.; MALCHIODI, E. L. Study of cases of leishmaniasis in the Province of Salta: evidences of mixed infection with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania sp.* **Medicina**, v. 56, p. 259-268, 1996.

CORDOVA, E.; BOSCHI, A.; AMBROSIONI, J.; CUDOS, C.; CORTI, M. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992-2007. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 587-592, 2008.

COSTA, J.; ALMEIDA, C. E.; DONSTON, E.; LINS, A.; VINHAES, M. C.; SILVEIRA, A. C.; BEARD, C. B. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 443-449, 2003.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J.; ALVES FILHO, F. I.; CASTRO JÁ, D. E.; CUNHA, R. V.; COSTA, W.; JUNQUEIRA, A. C. Morbidade da doença de Chagas em áreas do sertão da Paraíba e da caatinga do Piauí. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 197-205, 1996.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, p. 5–13, 2010.

COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, p. S6-S7, 2010.

DEANE, M. P.; LENZI, H. I.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal hosts, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 513-529, 1984.

DEGRAVE, W.; FRAGOSO, S. P.; BRITTO, C.; VAN HEUVERSWEYN, H.; KIDANE, G. Z.; CARDOSO, M. A.; MUELLER, R. U.; SIMPSON, L.; MOREL, C. M. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 27, p. 63-70, 1988.

DIAS, E. Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 35, p. 335-342, 1940.

DIAS, J. C. P.; MADOERY, R.; MADOERY, C.; CAMERA, M. L. Situación actual de la enfermedad de Chagas em las Americas. In: CONGRESO NACIONAL DE MEDICINA, 1993, Buenos Aires. **Actualizaciones en la enfermedad de Chagas**. Buenos Aires, 1993. p. 3-12.

DIAS, J. C. P.; MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

DIAS, F. B. S.; DIOTAIUTI, L.; ROMANHA, A. J.; BEZERRA, C. M.; MACHADO, M. M. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 643-645, 2007.

DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V.; GONZALEZ, A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, p. 616-623, 1992.

DIOTAIUTI, L.; AZEREDO, B. V.; BUSEK, S. C.; FERNANDES, A. J. Controle de *Triatoma sordida* em ambiente peridoméstico no Município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 3, p. 21-25, 1998.

DVORAK, J. A.; HALL, T. E.; CRANE, M. S.; ENGEL, J. C.; MCDANIEL, J. P.; URIEGAS, R. *Trypanosoma cruzi* flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mitramycin-induced fluorescence. **Journal of Protozoology**, v. 24, p. 430-437, 1982.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A.C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L. H.; HUANG, Y. T.; KINDLUND, E.; KTINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARTETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409-415, 2005.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **Journal of Immunology**, v. 109, p. 129-135, 1972.

- FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, S. A.; ROCHA, A.; SILVA, A. M. Doença de Chagas e imunossupressão. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (Org.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. p. 365-379.
- GARCIA, E. S.; GENTA, F. A.; AZAMBUJA, P.; SCHAUB, G. A. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 499–505, 2010.
- GIBSON, A. C.; MILES, M. A. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. **The EMBO Journal**, v. 5, p. 1299-1305, 1986.
- GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A.; LAFAILLE, J. J.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W. Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 53, p. 71-76, 1992.
- GOMES, M. L.; MACEDO, A. K.; VAGO, A. R.; PENA, S. D. J.; GALVÃO, L. M. C.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polimerase chain reaction for detection in human blood. **Experimental Parasitology**, v. 88, p. 28-33, 1998.
- GOMES, M. L.; GALVÃO, L. M. C.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Chagas disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 205-210, 1999.
- GOMES, Y. M.; PEREIRA, V. R. A.; NAKAZAWA, M.; ROSA, D. S.; BARROS, M. N. D. S.; FERREIRA, A. G. P.; SILVA, E. D.; OGATTA, S. F.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. Serodiagnosis of chronic Chagas Infection by using EIE-Recombinant-Chagas- Biomanguinhos kit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 497-501, 2001.
- GONZALEZ, A.; PREDIGER, E.; HUECAS, M. E.; NOGUEIRA, N.; LIZARDI, P. Minichromosomal Repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitivity parasite detection assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, p. 3356-3360, 1984.
- GUHL, F.; JARAMILLO, C.; CARRANZA, J. C.; VALLEJO, G. A. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 362-370, 2002.
- GUTIERREZ, F. R. S.; GUEDES, P. M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 673-685, 2009.
- HAMANO, S.; HORIO, M.; MIURA, S.; HIGO, H.; IIHOSHI, N.; NODA, K.; TADA, I.; TAKEUCHI, T. Detection of kinetoplast DNA of *Trypanosoma cruzi* from dried feces of triatomine bugs by PCR. **Parasitology International**, v. 50, p. 135-138, 2001.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; MARCINA, R. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J.; FRASCH, A. C.; PETTERSSON, U. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 42, p. 213-224, 1990.

HENRIKSSON, J.; PORCEL, B.; RYDAKER, M.; RUIZ, A.; SABAJ, V.; GALANTI, N.; CAZZULO, J. J.; FRASCH, A. C.; PETTERSSON, U. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 73, p. 63-74, 1995.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 12, p. 108-114, 1996.

HIGUCHI, M. L.; LOPES, E. A.; SALDANHA, L. B.; BARRETTO, A. C.; STOLF, N. A.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunopathologic studies in myocardial biopsies of patients with Chagas' disease and idiopathic cardiomyopathy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p. 87-90, 1986.

HUDSON, L.; GUHL, F.; MARINHELLE, C. J.; RODRIGUEZ, J. Use of monoclonal antibodies for the differential detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in epidemiological studies and xenodiagnosis. **Acta Tropica**, v. 44, p. 387-394, 1987.

JUNQUEIRA, A. C. V.; CHIARI, E.; WINCKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 129-132, 1996.

KIRCHHOFF, L. V.; VOTAVA, J. R.; OCHS, D. E.; MOSER, D. R. Comparison of PCR and Microscopic Methods for Detecting *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1171-1175, 1996.

KIRCHHOFF, L. V.; WEISS, L. M.; WITTNER, M.; TANOWITZ, H. B. Parasitic Diseases of the Heart. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 706-723, 2004.

KIRCHHOFF, L. V.; PAREDES, P.; LOMELI-GUERRERO, A.; PAREDES-ESPINOZA, M.; RON-GUERRERO, C. S.; DELGADO-MEJIA, M.; PENA-MUNOZ, J. G. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. **Transfusion**, v. 46, p. 298, 2006.

KOOY, R. F.; ASHALL, F.; VAN DER PLOEG, M.; OVERDULVE, J. P. On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 36, p. 73-76, 1989.

KRIEGER, M. A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W.; LAFAILLE, J. J.; PEREIRA, J. B.; CARVALHO, M. R.; GOLDENBERG, S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, p. 427-434, 1992.

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NBREGA, G. C.; MIRANDA, A. Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. **Circulation**, v. 14, p. 1035-1060, 1956.

LANAR, D. E.; LEVY, S. C.; MANNING, J. E. Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 3, p. 327-341, 1981.

LEIGUARDA, R.; RONCORONI, A.; TARATUTO, A.; JOST, L.; BERTHIER, M.; NOGUES, M.; FREILIJ, H. Acute CNS infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) in immunosuppressed patients. **Neurology**, v. 40, p. 850-851, 1990.

LENT, H.; VALDERRAMA, A. Observações, em laboratório, sobre o ciclo evolutivo de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, *R. pictipes* Stal, 1872 e *R. neivai* Lent, 1953. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 37, p. 325-344, 1977.

LIMA, F. M.; OLIVEIRA, P.; MORTARA, R. A.; SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **New Biotechnology**, v. 27, p. 837-843, 2010.

MAEKELT, G. A. A modified procedure of xenodiagnosis for Chagas disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, p. 11-15, 1964.

MAGUIRE, J. H. A risk score for predicting death in class Chagas' heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 2490-2491, 2006.

MALCHIODI, E. L.; CHIARAMONTE, M. G.; TARANTO, N. J.; ZWIRNER, N. W.; MARGNI, R. A. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag16386). **Clinical Experimental Immunology**, v. 97, p. 417-423, 1994.

MALLIMACI, M. C.; SIJVARGER, C.; DATES, A.; ALVAREZ, M.; SOSA-ESTANI, S. Seroprevalence of Chagas' disease in Ushuaia, Argentina, an area without Triatominae. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 9, p. 169-171, 2001.

MARSDEN, P. D.; CROLL, N. A.; CROSS, J. H. The transmission of *Trypanosoma cruzi* infection to man and its control. In: CROLL, N. A.; CROSS, J. H. (Ed.). **Human Ecology and Infections Disease**. London: Academic Press, 1983. p. 253-281.

MCDANIEL, J. P.; DVORAK, J. A. Identification, isolation and characterization of naturally occurring *Trypanosoma cruzi* variants. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 57, p. 213-222, 1993.

MICHAILOWSKY, V.; LUHRS, K.; ROCHA, M. O.; FOUTS, D.; GAZZINELLI, R. T.; MANNING, J. E. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 3165-3171, 2003.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 401-404, 1999.

- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.17-30, 2009.
- MORAES-SOUZA, H. Chagas infection transmission control: situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 419-423, 1999.
- MOREL, C. M.; LAZDINS, J. Chagas disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, p. 14-15, 2003.
- MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1477- 1482, 1989.
- NILSEN, T. W. Trans-splicing in protozoa and helminthes. **Infectious Agents and Disease**, v. 7, p. 212- 218, 1992.
- NOBEL Prize. Disponível em:<<http://www.nobelprize.org>>. Acesso em: 2 Mar. 2012.
- NOBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, R.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W. N. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 653-655, 2009.
- PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. **Revista Saúde Pública**, v. 37, p. 107-115, 2003.
- PRATA, A. Chaga's disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 8, p. 61-76, 1994.
- PIRON, M.; FISA, R.; CASAMITJANA, N.; LOPEZ-CHEJADE, P.; PUIG, L.; VERGES, M.; GASCON, J.; PRAT, J. G.; PORTUS, M.; SAULEDA, S. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta Tropica**, v. 103, p. 195-200, 2007.
- RASSI, A.; RASSI, J. A.; RASSI, G. G. Fase aguda. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 231-244.
- REQUENA, J. M.; LOPEZ, M. C.; ALONSO, C. Genomic repetitive DNA Elements of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 12, p. 279-282, 1996.
- REZENDE-FILHO, J.; MOREIRA-JUNIOR, H.; REZENDE, J. M.; COURA, J. R. Métodos radiológicos e manométricos para o diagnóstico da esofagopatia e da colopatia chagásica. In: COURA, J. R. (Ed.). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 653-666.
- REZENDE, R. E. F.; LESCANO, M. A.; RAMALHO, L. N. Z.; FIGUEIREDO, J. F. D.; DANTAS, R. O.; MENEGHELLI, U. G.; MODENA, J. L. P. Chagas' disease in a patient

with non-Hodgkin's lymphoma: gastric, oesophageal and laryngeal involvement. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 74-78, 2006.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; NISHIYA, A. S.; SABINO, E. C.; CHAMONE, D. F.; SÁEZ-ALQUÉZER, A. An improved, PCR based strategy for the detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 93, p. 689-694, 1999.

RUSSOMANDO, G.; FIGUEREDO, A.; ALMIRON, M.; SAKAMOTO, M.; MORITA, K. Polymerase Chain Reaction-Based Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2864-2868, 1992.

RUSSOMANDO, G.; ARIAS, A. R.; ALMIRON, M.; FIGUEREDO, A.; FERREIRA, M. E.; MORITA, K. *Trypanosoma cruzi*: Polymerase Chain Reaction-BAsed Detection in Dried Feces of *Triatoma infestans*. **Experimental Parasitology**, v. 83, p. 62-66, 1996.

SANTOS M. C. A.; SLEEGERS, C. A.; SILVEIRA, C. A.; CASTRO, C.; SANTIAGO, W. Estudos comparativos entre xenodiagnóstico artificial e hemocultura para doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 81, 1999.

SCHENONE H.; ALFARO, E.; REYES, H.; TAUCHER, E. Valor del xenodiagnóstico en la infección chagásica crônica. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 23, p. 149-154, 1968.

SCHIJMAN, A. G.; BISIO, K.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; JARAMILLO, A. M. M.; CURA, C.; AUTER, F.; VERON, V.; QVARNSTROM, Y.; DEBORGGRAEVE, S.; HIJAR, G.; ZULANTAY, I.; LUCERO, R. H.; VELAZQUEZ, E.; TELLEZ, T.; LEON, Z. S.; GALVÃO, L.; NOLDER, D.; RUMI, M. M.; LEVI, J. E.; RAMIREZ, J. D.; ZORRILLA, C. I.; VIANA, K. A.; YACHELINI, P.; TORRICO, F.; ROBELLO, C.; DIOSQUE, P.; CHAVEZ, O. T.; AZNAR, C.; RUSSOMANDO, G.; BÜSCHER P.; ASSAL, A.; GUHL, F.; ESTANI, S. S.; DA-SILVA, A.; BRITTO, C.; LUQUETTI, A.; LADZINS, J. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e931, 2011.

SCHMUNIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*, the etiológica agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, v. 31, p. 547-557, 1991.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, 2007.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. P. The Southern Cone Programme against Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 42, p. 1-27, 1999.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, p. 88-100, 2009.

SEGURA, E. L.; CURA, E. N.; ESTANI, S. A.; ANDRADE, J.; LANSETTI, J. C.; DE RISSIO, A. M.; CAMPANINI, A.; BLANCO, S. B.; GURTLER, R. E.; ALVAREZ, M. Long-term effects of a nationwide control program on the seropositivity for *Trypanosoma*

cruzi infection in young men from Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, p. 353-362, 2000.

SILBER, A. M.; BÚA, J.; PORCEL, B. M.; SEGURA, E. L.; RUIZ, A. M. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. **Experimental Parasitology**, v. 85, p. 225-232, 1997.

SILVA, E. D.; PEREIRA, V. A.; GOMES, J. A. S.; LORENA, V. M. B.; CANÇADO, J. R.; FERREIRA, A. G. P.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. M. Use of EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. **Journal Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, p. 132-136, 2002.

SILVEIRA, J. F.; BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 127-147, 2000.

SLOOF, P.; BOS, J. L.; KONINGS, A. F. J. M.; MENKE, H. H.; BORST, P.; GUITTERRIDGE, W. E.; LEON, W. Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Molecular Biology**, v. 167, p. 1-21, 1983.

SOLARI, A. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. **Chromosoma**, v. 78, p. 239-255, 1980.

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells amplification of kinetoplast minicircle DNA sequence: use in diagnosis of Chagas disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, p. 205-14, 1989.

TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, S. A.; MORRIS, L. M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, p. 400-419, 1992.

THOMPSON, C.; DVORAK, J.A. Quantitation of total DNA per cell in an exponentially growing population using the diphenylamine reaction and flow cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 177, p. 353-357, 1989.

UMEZAWA, E. S.; BASTOS, S.; CAMARGO, M. E.; YAMAUCHI, L. M.; SANTOS, M. R.; GONZALEZ, A.; ZINGALES, B.; LEVIN, M. J.; SOUSA, O.; RANGEL-ALDAO, R.; SILVEIRA, J. F. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1554-1560, 1999.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; D'AVILA REIS, D.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES JUNIOR, S.; MOREIRA, M. C.; BRASILEIRO FILHO, G.; PENA, S. D. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **American Journal Pathology**, v. 156, p. 1805-1809, 2000.

VALENCIA, A. T. **Investigacion Epidemiologica de la enfermedad de Chagas**. La Paz: Ministerio de Accion Social y Salud Publica, 1990.

VASQUEZ, J. E.; KRUSGELL, J.; ORN, A.; SOUSA, O. E.; HARRIS, R. A. Serological diagnosis of *Trypanosoma rangeli* infected patients. A comparison of different methods and its implications for the diagnosis of Chagas disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 45, p. 322-330, 1997.

VOLLER, A.; DRAPER, C.; BIDWELL, D. E.; BARLETT, A. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease. **The Lancet**, v. 1, p. 426-429, 1975.

WHO. **Health systems: improving performance**. Geneva, 2000a.

WHO. **Control of Chagas disease**. Geneva, 2000b

WINCKER, P.; BRITTO, C.; BORGES-PEREIRA, J.; CARDOSO, M. A.; OELEMANN, W.; MOREL, C. M. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 771-777, 1994.

WINCKER, P.; BOSSENO, M. F.; BRITTO, C.; YAKSIC, N.; CARDOSO, M. A.; MOREL, C. M.; BRENIÈRE, S. F. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. **FEMS Microbiology Letters**, v. 124, p. 419-424, 1994.

YEN, P.; FINLEY, S. D.; ENGEL-STEFANINI, M. O.; POPEL, A. S. A Two-Compartment Model of VEGF Distribution in the Mouse. **PLoS ONE**, v. 6, p. 0027514, 2011.

ZICKER, F.; SMITH, P. G.; LUQUETTI, A. O.; OLIVEIRA, O. S. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter-paper. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, p. 465-471, 1990.

ZULANTAY, I.; APT, W.; GIL, L. C.; ROCHA, C.; MUNDACA, K.; SOLARI, A.; SÁNCHEZ, G.; RODRIGUEZ, C.; MARTÍNEZ, G.; DE PABLOS, L. M.; SANDOVAL, L.; RODRÍGUEZ, J.; VILCHEZ, S.; OSUNA, A. The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 101, p. 673-679, 2007.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
SETOR DE PARASITOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)

Nós o(a) convidamos a participar de uma pesquisa intitulada “ Exame de PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase) como diagnóstico complementar na Doença de Chagas”, trabalho de dissertação de Mestrado em Patologia do estudante Allan Rodrigo Soares Maia, sob a orientação da Prof(a). Dra. Maria Jania Teixeira, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Esta pesquisa tem por finalidade a avaliação do diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* (protozoário causador da Doença de Chagas) por meio do exame de PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase) que irá detectar o material genético do parasito causador da Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*. Esta técnica que é defendida pela OMS (Organização Mundial de Saúde) como o padrão de exame mais sensível e específico para o diagnóstico da Doença de Chagas.

Este exame requer a coleta de, aproximadamente, 5,0 mL de sangue periférico por meio de tubo do tipo Vacutainer.

Este procedimento não trará risco nem desconforto ao(a) paciente e será efetuado por profissional qualificado.

O voluntário será beneficiado por meio do exame diagnóstico aprovado pela Organização Mundial de Saúde que resulta em 99,99% de sensibilidade e especificidade para a detecção do protozoário *Trypanosoma cruzi* que origina a Doença de Chagas.

É necessário esclarecer que: **1.** O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento na instituição; **2.** As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente; **3.** O voluntário tem o direito de ser mantido atualizado sobre resultados parciais da pesquisa; **4.** Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa; **5.** O pesquisador tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa; **6.** Em qualquer etapa do

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
(CONTINUAÇÃO)

estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Maria Jânia Teixeira que pode ser encontrada no endereço: Rua Alexandre Baraúna, 949 (Departamento de Patologia e Medicina Legal); telefone: (0**85) 3366-8310.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC – Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589; e-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

Caso você se sinta suficientemente informado(a) a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se você concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

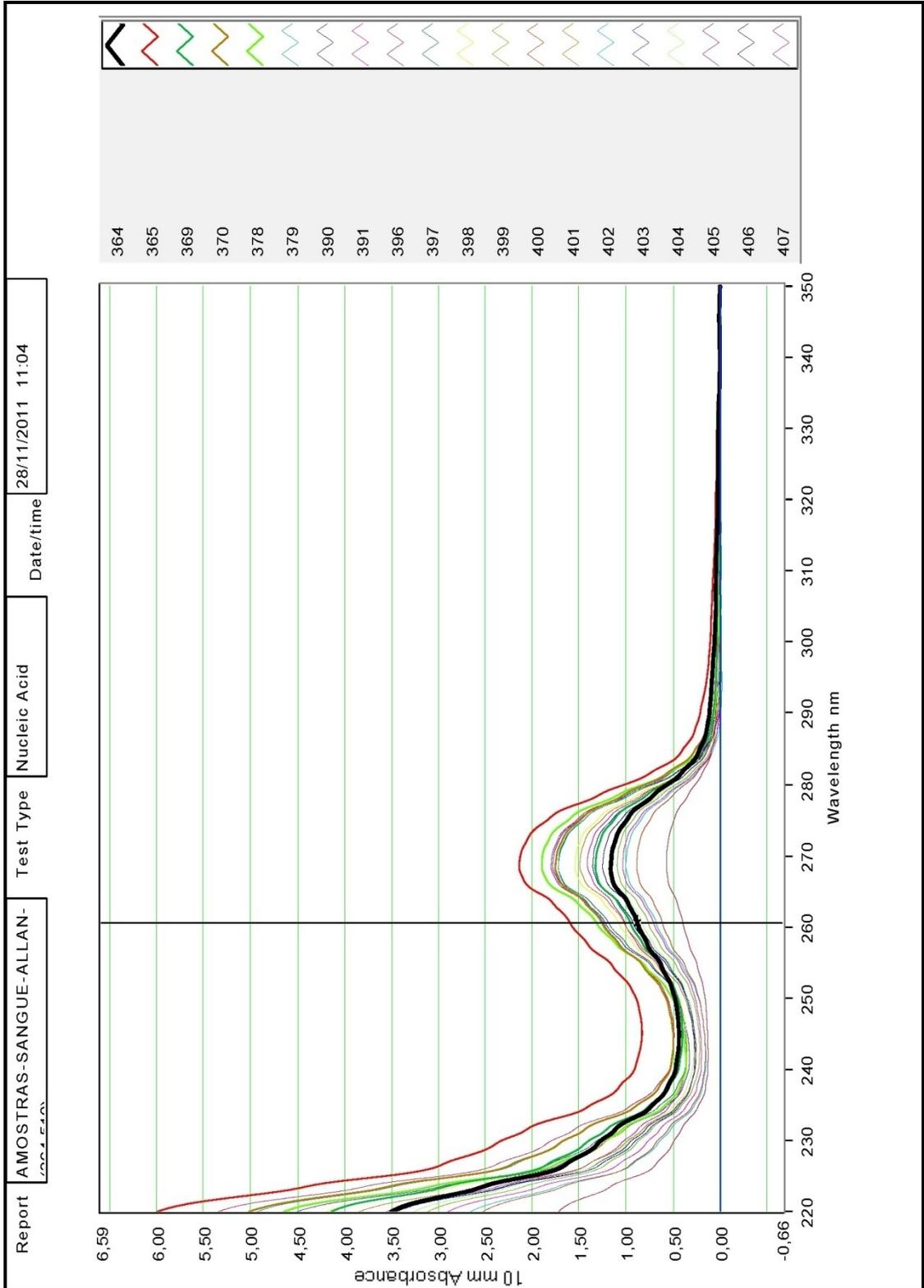
(Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

APÊNDICE B - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE SANGUE RESSUSPENDIDAS EM 200 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-510)



APÊNDICE B - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE SANGUE RESSUSPENDIDAS EM 200 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-446) (CONTINUAÇÃO)

| Report | AMOSTRAS-SANGUE | Test Type | Nucleio Acid | Date/time | Page # | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------|-----------|--------------|-----------|--------|-------|---------|---------|----------|-------------|-------------|---------|------------------|-----------------|-------------------|
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A260 | A260 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
| 364 | Default | 5/10/2011 | 09:27 | 43,25 | 0,658 | 1,55 | 0,68 | 50,00 | 50,00 | 230 | 1,295 | 0,038 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 365 | Default | 5/10/2011 | 09:30 | 78,62 | 1,572 | 1,011 | 1,55 | 0,68 | 50,00 | 230 | 2,321 | 0,377 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 366 | Default | 5/10/2011 | 09:33 | 46,96 | 0,937 | 0,598 | 1,57 | 0,67 | 50,00 | 230 | 1,391 | 0,020 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 370 | Default | 5/10/2011 | 09:35 | 61,70 | 1,234 | 0,790 | 1,56 | 0,74 | 50,00 | 230 | 1,660 | 0,007 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 378 | Default | 5/10/2011 | 09:38 | 64,46 | 1,289 | 0,813 | 1,59 | 1,05 | 50,00 | 230 | 1,231 | -0,010 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 379 | Default | 5/10/2011 | 09:41 | 60,90 | 1,218 | 0,749 | 1,63 | 0,74 | 50,00 | 230 | 1,649 | 0,026 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 390 | Default | 5/10/2011 | 09:42 | 45,29 | 0,906 | 0,584 | 1,55 | 1,01 | 50,00 | 230 | 0,993 | 0,022 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 391 | Default | 5/10/2011 | 09:44 | 34,56 | 0,691 | 0,420 | 1,64 | 0,91 | 50,00 | 230 | 0,758 | 0,048 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 396 | Default | 5/10/2011 | 09:46 | 19,24 | 0,395 | 0,293 | 1,45 | 0,79 | 50,00 | 230 | 0,496 | -0,007 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 397 | Default | 5/10/2011 | 09:48 | 58,00 | 1,160 | 0,709 | 1,64 | 0,89 | 50,00 | 230 | 1,305 | 0,025 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 398 | Default | 6/10/2011 | 09:59 | 53,00 | 1,060 | 0,653 | 1,62 | 0,89 | 50,00 | 230 | 1,195 | 0,007 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 399 | Default | 6/10/2011 | 10:01 | 37,33 | 0,747 | 0,491 | 1,62 | 0,87 | 50,00 | 230 | 0,862 | 0,030 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 400 | Default | 6/10/2011 | 10:03 | 30,07 | 0,601 | 0,399 | 1,63 | 0,91 | 50,00 | 230 | 0,862 | 0,007 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 401 | Default | 6/10/2011 | 10:05 | 49,96 | 0,999 | 0,620 | 1,61 | 1,02 | 50,00 | 230 | 0,890 | 0,009 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 402 | Default | 6/10/2011 | 10:07 | 33,28 | 0,666 | 0,403 | 1,65 | 1,05 | 50,00 | 230 | 0,835 | 0,022 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 403 | Default | 6/10/2011 | 10:08 | 58,92 | 1,198 | 0,732 | 1,64 | 1,00 | 50,00 | 230 | 1,198 | 0,053 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 404 | Default | 6/10/2011 | 10:11 | 40,66 | 0,813 | 0,488 | 1,67 | 0,84 | 50,00 | 230 | 0,955 | 0,044 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 405 | Default | 6/10/2011 | 10:14 | 62,05 | 1,241 | 0,777 | 1,60 | 0,69 | 50,00 | 230 | 1,789 | 0,138 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 406 | Default | 6/10/2011 | 10:15 | 42,60 | 0,852 | 0,533 | 1,60 | 0,91 | 50,00 | 230 | 0,638 | 0,026 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 407 | Default | 6/10/2011 | 10:17 | 49,87 | 0,997 | 0,620 | 1,61 | 0,98 | 50,00 | 230 | 1,019 | 0,471 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 420 | Default | 6/10/2011 | 10:19 | 45,36 | 0,907 | 0,565 | 1,60 | 0,90 | 50,00 | 230 | 1,012 | 0,023 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 423 | Default | 6/10/2011 | 10:21 | 45,66 | 0,913 | 0,571 | 1,60 | 0,79 | 50,00 | 230 | 1,152 | 0,051 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 424 | Default | 6/10/2011 | 10:23 | 83,55 | 1,671 | 1,051 | 1,59 | 0,84 | 50,00 | 230 | 1,999 | 0,024 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 425 | Default | 6/10/2011 | 10:25 | 40,73 | 0,815 | 0,514 | 1,58 | 0,80 | 50,00 | 230 | 1,015 | 0,036 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 426 | Default | 6/10/2011 | 10:27 | 17,34 | 0,347 | 0,201 | 1,73 | 0,71 | 50,00 | 230 | 0,490 | 0,033 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 427 | Default | 6/10/2011 | 10:29 | 16,99 | 0,338 | 0,206 | 1,64 | 0,75 | 50,00 | 230 | 0,449 | 0,013 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 436 | Default | 6/10/2011 | 10:30 | 16,93 | 0,339 | 0,200 | 1,69 | 0,58 | 50,00 | 230 | 0,579 | 0,011 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 437 | Default | 6/10/2011 | 10:32 | 15,01 | 0,300 | 0,168 | 1,79 | 0,76 | 50,00 | 230 | 0,397 | 0,014 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 438 | Default | 6/10/2011 | 10:34 | 17,50 | 0,350 | 0,201 | 1,74 | 0,69 | 50,00 | 230 | 0,508 | 0,009 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 446 | Default | 6/10/2011 | 10:36 | 13,48 | 0,270 | 0,151 | 1,79 | 0,58 | 50,00 | 230 | 0,463 | 0,014 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |

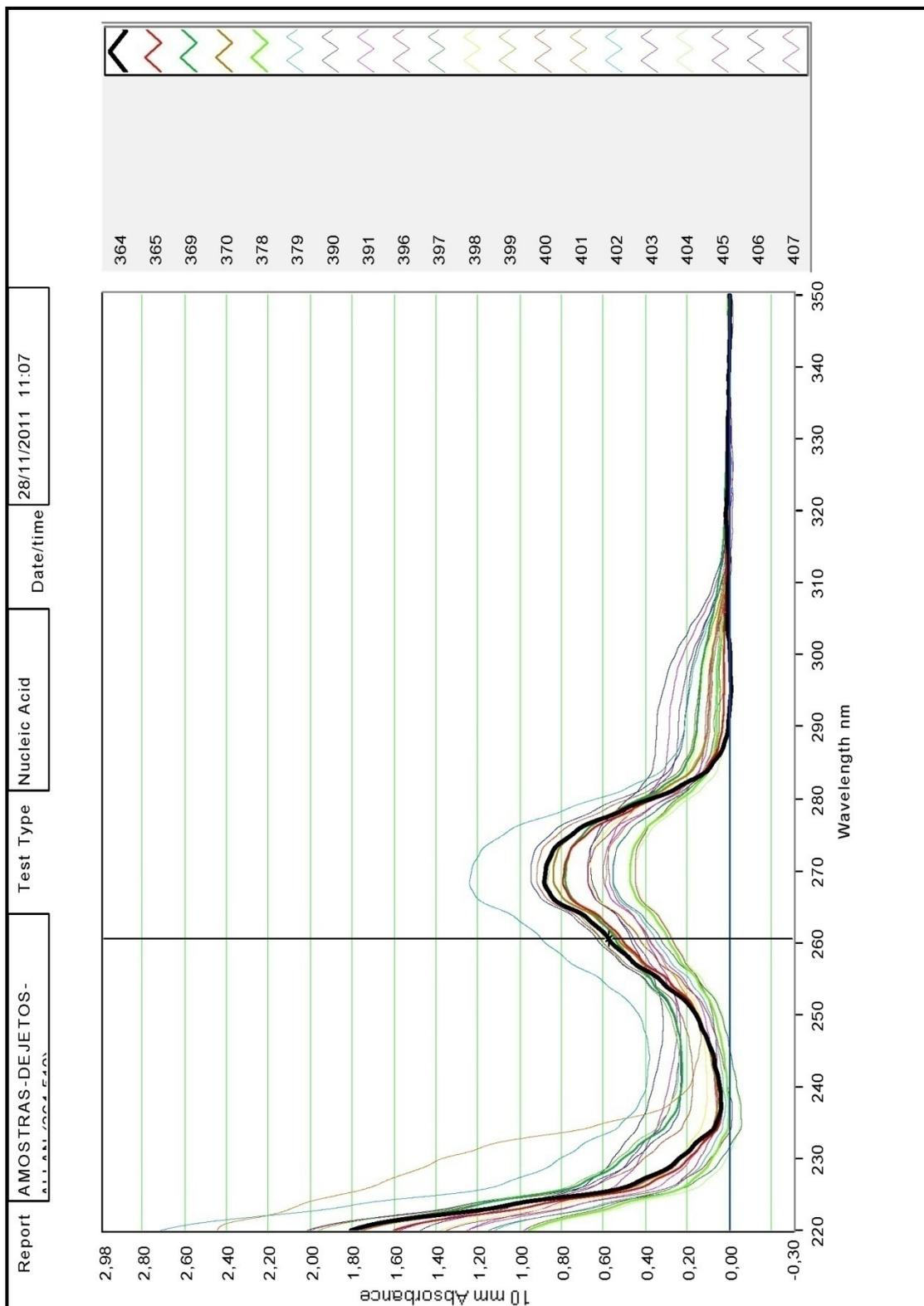
APÊNDICE B - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE SANGUE RESSUSPENDIDAS EM 200 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (447-501) (CONTINUAÇÃO)

| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A260 | A260 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
|-----------|---------|------------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|----------|-------------|-------------|---------|------------------|-----------------|-------------------|
| 447 | Default | 6/10/2011 | 10:37 | 14,73 | 0,295 | 0,176 | 1,67 | 0,70 | 50,00 | 230 | 0,418 | 0,039 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 448 | Default | 6/10/2011 | 10:39 | 27,82 | 0,556 | 0,331 | 1,68 | 0,78 | 50,00 | 230 | 0,715 | 0,020 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 449 | Default | 6/10/2011 | 10:41 | 15,08 | 0,302 | 0,180 | 1,68 | 0,74 | 50,00 | 230 | 0,409 | 0,023 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 450 | Default | 7/10/2011 | 11:50 | 16,92 | 0,338 | 0,241 | 1,40 | 0,61 | 50,00 | 230 | 0,553 | 0,074 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 457 | Default | 7/10/2011 | 11:50 | 17,76 | 0,355 | 0,233 | 1,52 | 0,65 | 50,00 | 230 | 0,645 | 0,018 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 467 | Default | 7/10/2011 | 11:51 | 14,01 | 0,280 | 0,186 | 1,50 | 0,66 | 50,00 | 230 | 0,425 | -0,005 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 468 | Default | 7/10/2011 | 11:52 | 17,14 | 0,343 | 0,233 | 1,47 | 0,74 | 50,00 | 230 | 0,463 | -0,036 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 469 | Default | 7/10/2011 | 11:52 | 16,12 | 0,322 | 0,225 | 1,43 | 0,45 | 50,00 | 230 | 0,719 | 0,117 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/24 |
| 471 | Default | 13/10/2011 | 10:25 | 20,04 | 0,401 | 0,253 | 1,58 | 0,56 | 50,00 | 230 | 0,716 | 0,420 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 472 | Default | 13/10/2011 | 10:26 | 63,94 | 1,279 | 0,458 | 2,79 | 0,50 | 50,00 | 230 | 2,560 | 0,350 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 473 | Default | 13/10/2011 | 10:28 | 16,48 | 0,330 | 0,205 | 1,60 | 0,52 | 50,00 | 230 | 0,637 | 0,028 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 474 | Default | 13/10/2011 | 10:29 | 17,49 | 0,350 | 0,237 | 1,48 | 0,54 | 50,00 | 230 | 0,644 | 0,009 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 475 | Default | 13/10/2011 | 10:30 | 22,87 | 0,457 | 0,298 | 1,53 | 0,44 | 50,00 | 230 | 1,038 | 0,156 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 477 | Default | 13/10/2011 | 10:34 | 24,12 | 0,482 | 0,300 | 1,61 | 0,63 | 50,00 | 230 | 0,765 | 0,047 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 479 | Default | 13/10/2011 | 10:35 | 14,97 | 0,299 | 0,199 | 1,59 | 0,55 | 50,00 | 230 | 0,544 | 0,057 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 480 | Default | 13/10/2011 | 10:36 | 24,45 | 0,489 | 0,330 | 1,48 | 0,21 | 50,00 | 230 | 2,390 | 0,033 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 481 | Default | 13/10/2011 | 10:38 | 19,48 | 0,390 | 0,252 | 1,55 | 0,19 | 50,00 | 230 | 2,082 | 0,129 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 487 | Default | 13/10/2011 | 11:30 | 19,01 | 0,360 | 0,248 | 1,54 | 0,15 | 50,00 | 230 | 2,526 | -0,003 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 488 | Default | 13/10/2011 | 11:31 | 30,61 | 0,612 | 0,404 | 1,51 | 0,18 | 50,00 | 230 | 3,496 | -0,010 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 489 | Default | 13/10/2011 | 11:33 | 36,75 | 0,735 | 0,490 | 1,50 | 0,25 | 50,00 | 230 | 2,916 | 0,009 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 491 | Default | 13/10/2011 | 11:34 | 32,45 | 0,649 | 0,413 | 1,57 | 0,19 | 50,00 | 230 | 3,358 | -0,040 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 492 | Default | 13/10/2011 | 11:36 | 31,20 | 0,624 | 0,402 | 1,55 | 0,22 | 50,00 | 230 | 2,885 | -0,012 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 493 | Default | 13/10/2011 | 11:37 | 35,93 | 0,719 | 0,488 | 1,54 | 0,20 | 50,00 | 230 | 3,635 | 0,008 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 494 | Default | 13/10/2011 | 11:38 | 32,85 | 0,667 | 0,418 | 1,57 | 0,20 | 50,00 | 230 | 3,222 | 0,050 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 495 | Default | 13/10/2011 | 11:39 | 31,83 | 0,637 | 0,420 | 1,52 | 0,20 | 50,00 | 230 | 3,219 | 0,079 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 497 | Default | 13/10/2011 | 11:41 | 33,82 | 0,676 | 0,431 | 1,57 | 0,13 | 50,00 | 230 | 5,304 | 0,003 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 498 | Default | 13/10/2011 | 11:43 | 32,54 | 0,651 | 0,400 | 1,63 | 0,11 | 50,00 | 230 | 6,121 | 0,002 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 499 | Default | 13/10/2011 | 11:44 | 30,45 | 0,609 | 0,405 | 1,51 | 0,22 | 50,00 | 230 | 2,800 | -0,022 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 500 | Default | 13/10/2011 | 11:46 | 33,98 | 0,680 | 0,444 | 1,53 | 0,17 | 50,00 | 230 | 4,015 | 0,010 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |
| 501 | Default | 13/10/2011 | 11:48 | 28,23 | 0,585 | 0,393 | 1,61 | 0,21 | 50,00 | 230 | 2,720 | 0,044 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000980,57H12/16 |

APÊNDICE B - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE SANGUE RESSUSPENDIDAS EM 200 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (502-510) (CONTINUAÇÃO)

| Report | | AMOSTRAS-SANGUE | | Test Type | | Nucleio Acid | | Date/Time | | 28/11/2011 11:04 | | Page # | | 3 | |
|-----------|---------|-----------------|-------|-----------|-------|--------------|---------|-----------|----------|------------------|-------------|---------|------------------|-----------------|----------------------|
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
| 502 | Default | 13/10/2011 | 11:49 | 25,39 | 0,508 | 0,312 | 1,63 | 0,15 | 50,00 | 230 | 3,327 | 0,001 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/112/16 |
| 503 | Default | 13/10/2011 | 11:50 | 18,11 | 0,382 | 0,250 | 1,53 | 0,19 | 50,00 | 230 | 2,022 | -0,029 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/112/16 |
| 504 | Default | 13/10/2011 | 11:51 | 28,85 | 0,577 | 0,365 | 1,58 | 0,18 | 50,00 | 230 | 3,128 | -0,019 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/112/16 |
| 506 | Default | 13/10/2011 | 11:53 | 22,39 | 0,448 | 0,274 | 1,63 | 0,17 | 50,00 | 230 | 2,647 | 0,019 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/112/16 |
| 507 | Default | 13/10/2011 | 11:54 | 28,75 | 0,595 | 0,373 | 1,60 | 0,13 | 50,00 | 230 | 4,575 | 0,009 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/112/16 |
| 508 | Default | 13/10/2011 | 11:56 | 43,49 | 0,870 | 0,548 | 1,59 | 0,23 | 50,00 | 230 | 3,856 | 0,021 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/112/16 |
| 509 | Default | 13/10/2011 | 11:57 | 35,13 | 0,703 | 0,442 | 1,59 | 0,15 | 50,00 | 230 | 4,597 | 0,001 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/112/16 |
| 510 | Default | 13/10/2011 | 11:58 | 24,16 | 0,483 | 0,305 | 1,58 | 0,19 | 50,00 | 230 | 2,507 | -0,007 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/112/16 |

APÊNDICE C - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE DEJETOS RESSUSPENDIDAS EM 200 μ L DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-510)



APÊNDICE C - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE DEJETOS RESSUSPENDIDAS EM 200 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-446) (CONTINUAÇÃO)

| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A 260 | A 280 | 260/280 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
|-----------|---------|------------|-------|-------|-------|-------|---------|----------|-------------|-------------|---------|------------------|------------------|-----------------------|
| 364 | Default | 14/10/2011 | 08:24 | 25.13 | 0.563 | 0.372 | 1.51 | 2.35 | 230 | 0.239 | 0.543 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 365 | Default | 14/10/2011 | 08:26 | 25.09 | 0.502 | 0.350 | 1.43 | 2.56 | 230 | 0.196 | 0.028 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 366 | Default | 14/10/2011 | 08:28 | 26.80 | 0.636 | 0.422 | 1.27 | 1.06 | 230 | 0.508 | 0.065 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 370 | Default | 14/10/2011 | 08:29 | 25.94 | 0.519 | 0.412 | 1.26 | 2.26 | 230 | 0.229 | 0.002 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 378 | Default | 14/10/2011 | 08:30 | 14.25 | 0.285 | 0.230 | 1.24 | 3.43 | 230 | 0.083 | -0.029 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 379 | Default | 14/10/2011 | 08:31 | 44.04 | 0.881 | 0.631 | 1.40 | 1.09 | 230 | 0.808 | 0.143 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 390 | Default | 14/10/2011 | 08:32 | 31.00 | 0.620 | 0.520 | 1.19 | 1.37 | 230 | 0.453 | 0.028 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 391 | Default | 14/10/2011 | 08:34 | 18.61 | 0.372 | 0.304 | 1.22 | 2.02 | 230 | 0.184 | 0.011 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 396 | Default | 14/10/2011 | 08:35 | 20.93 | 0.419 | 0.296 | 1.42 | 4.58 | 230 | 0.091 | 0.012 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 397 | Default | 14/10/2011 | 08:37 | 15.93 | 0.319 | 0.264 | 1.21 | 8.49 | 230 | 0.038 | -0.022 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 398 | Default | 14/10/2011 | 08:39 | 20.65 | 0.413 | 0.364 | 1.13 | 1.71 | 230 | 0.242 | 0.008 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 399 | Default | 14/10/2011 | 08:40 | 30.06 | 0.601 | 0.420 | 1.43 | 1.13 | 230 | 0.633 | 0.051 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 400 | Default | 14/10/2011 | 08:42 | 30.16 | 0.603 | 0.476 | 1.27 | 1.48 | 230 | 0.408 | 0.004 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 401 | Default | 14/10/2011 | 08:43 | 18.78 | 0.376 | 0.297 | 1.26 | 0.27 | 230 | 1.367 | 4.671 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 402 | Default | 14/10/2011 | 08:45 | 17.25 | 0.345 | 0.273 | 1.27 | 2.96 | 230 | 0.116 | -0.004 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 403 | Default | 14/10/2011 | 08:46 | 22.33 | 0.447 | 0.417 | 1.07 | 0.95 | 230 | 0.472 | 0.188 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 404 | Default | 14/10/2011 | 08:47 | 13.06 | 0.261 | 0.193 | 1.36 | 18.36 | 230 | 0.014 | -0.002 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 405 | Default | 14/10/2011 | 08:49 | 13.31 | 0.266 | 0.248 | 1.08 | 1.88 | 230 | 0.142 | 0.055 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 406 | Default | 14/10/2011 | 08:50 | 23.19 | 0.464 | 0.480 | 0.97 | 0.84 | 230 | 0.555 | 0.073 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 407 | Default | 14/10/2011 | 08:52 | 19.45 | 0.389 | 0.407 | 0.95 | 0.91 | 230 | 0.428 | 0.139 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 420 | Default | 14/10/2011 | 08:54 | 10.49 | 0.210 | 0.163 | 1.28 | 2.61 | 230 | 0.080 | 0.018 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 423 | Default | 14/10/2011 | 08:55 | 16.23 | 0.325 | 0.331 | 0.88 | 0.72 | 230 | 0.452 | 0.040 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 424 | Default | 14/10/2011 | 08:56 | 13.65 | 0.273 | 0.219 | 1.25 | 1.71 | 230 | 0.160 | 0.007 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 425 | Default | 14/10/2011 | 08:57 | 10.65 | 0.213 | 0.174 | 1.22 | 1.36 | 230 | 0.156 | 0.013 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 426 | Default | 14/10/2011 | 08:58 | 19.77 | 0.395 | 0.296 | 1.34 | 2.48 | 230 | 0.159 | -0.009 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 427 | Default | 14/10/2011 | 08:59 | 17.43 | 0.349 | 0.290 | 1.20 | 2.93 | 230 | 0.119 | -0.118 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 436 | Default | 14/10/2011 | 10:00 | 16.11 | 0.322 | 0.278 | 1.16 | 3.52 | 230 | 0.092 | 0.584 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 437 | Default | 14/10/2011 | 10:01 | 17.84 | 0.357 | 0.256 | 1.40 | 10.49 | 230 | 0.034 | -0.007 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 438 | Default | 14/10/2011 | 10:02 | 14.94 | 0.299 | 0.239 | 1.25 | 3.05 | 230 | 0.098 | 0.010 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 446 | Default | 14/10/2011 | 10:04 | 37.14 | 0.743 | 0.491 | 1.51 | 1.71 | 230 | 0.434 | 0.084 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |

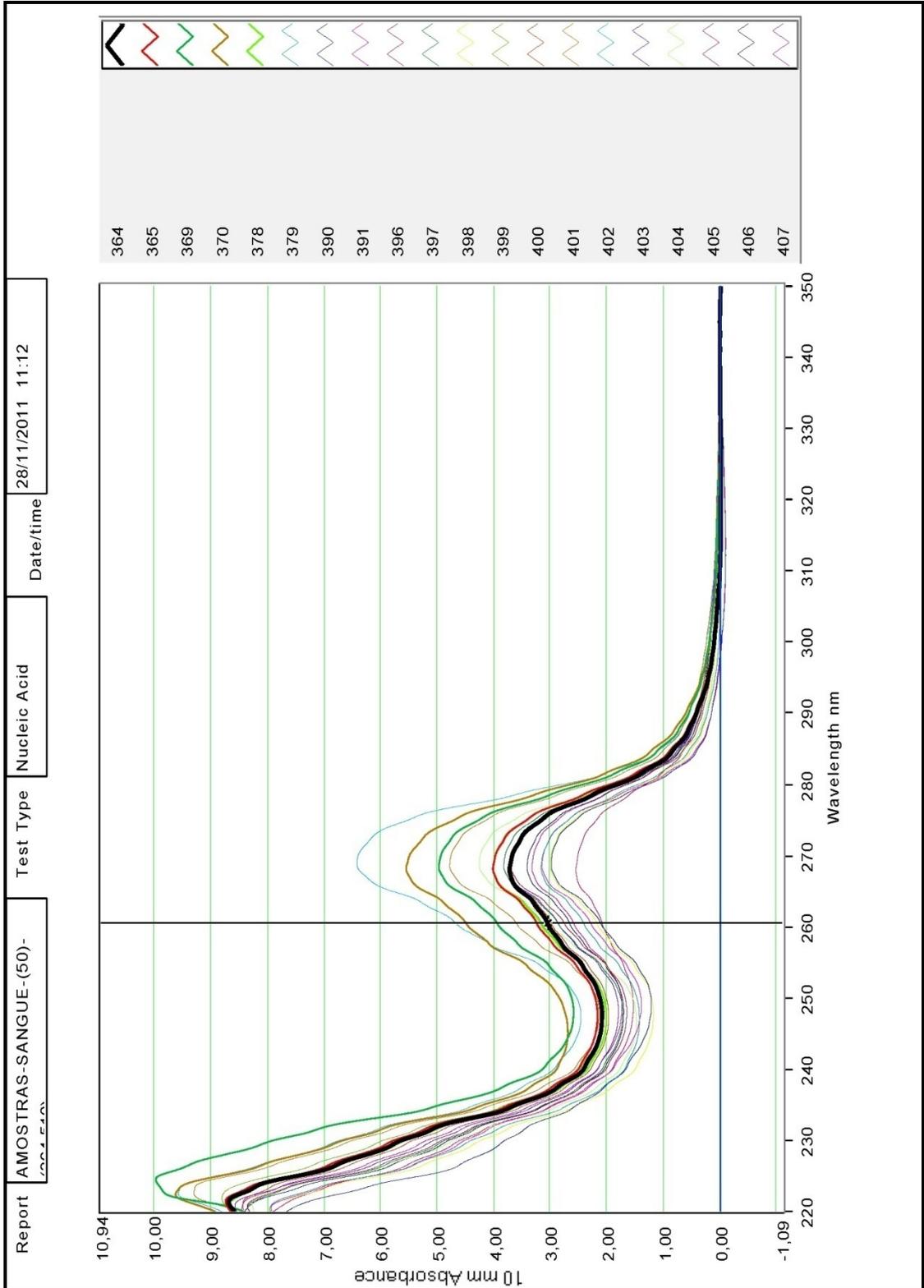
APÊNDICE C - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE DEJETOS RESSUSPENDIDAS EM 200 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (447-501) (CONTINUAÇÃO)

| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A 260 | A 280 | 260/280 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
|-----------|---------|------------|-------|-------|-------|-------|---------|----------|-------------|-------------|---------|------------------|------------------|-----------------------|
| 447 | Default | 14/10/2011 | 10:05 | 10,95 | 0,219 | 0,162 | 1,35 | -14,19 | 50,00 | 230 | -0,015 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 448 | Default | 14/10/2011 | 10:07 | 14,57 | 0,291 | 0,201 | 1,45 | 3,15 | 50,00 | 230 | 0,093 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 449 | Default | 14/10/2011 | 10:09 | 16,22 | 0,324 | 0,252 | 1,29 | 1,74 | 50,00 | 230 | 0,186 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 450 | Default | 14/10/2011 | 10:10 | 19,18 | 0,384 | 0,368 | 1,04 | 1,80 | 50,00 | 230 | 0,213 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 457 | Default | 14/10/2011 | 10:11 | 23,11 | 0,462 | 0,358 | 1,29 | 0,85 | 50,00 | 230 | 0,254 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 467 | Default | 14/10/2011 | 10:12 | 17,77 | 0,355 | 0,266 | 1,34 | 8,70 | 50,00 | 230 | 0,041 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 468 | Default | 14/10/2011 | 10:13 | 16,69 | 0,334 | 0,303 | 1,10 | 2,32 | 50,00 | 230 | 0,144 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 469 | Default | 14/10/2011 | 10:15 | 15,84 | 0,317 | 0,257 | 1,23 | 2,34 | 50,00 | 230 | 0,135 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 471 | Default | 14/10/2011 | 10:16 | 23,92 | 0,478 | 0,405 | 1,18 | 1,08 | 50,00 | 230 | 0,442 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 472 | Default | 14/10/2011 | 10:17 | 16,24 | 0,325 | 0,252 | 1,29 | 4,05 | 50,00 | 230 | 0,080 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 473 | Default | 14/10/2011 | 10:19 | 11,11 | 0,222 | 0,173 | 1,28 | -5,96 | 50,00 | 230 | -0,037 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 474 | Default | 14/10/2011 | 10:20 | 16,09 | 0,362 | 0,344 | 1,05 | 1,32 | 50,00 | 230 | 0,274 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 475 | Default | 14/10/2011 | 10:21 | 24,49 | 0,490 | 0,390 | 1,26 | 1,34 | 50,00 | 230 | 0,366 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 477 | Default | 14/10/2011 | 10:22 | 68,33 | 1,367 | 3,304 | 0,41 | 0,40 | 50,00 | 230 | 3,425 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 479 | Default | 14/10/2011 | 10:23 | 21,86 | 0,437 | 0,335 | 1,30 | 2,86 | 50,00 | 230 | 0,163 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 480 | Default | 14/10/2011 | 10:24 | 15,87 | 0,317 | 0,296 | 1,07 | 2,69 | 50,00 | 230 | 0,118 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 481 | Default | 14/10/2011 | 10:25 | 9,31 | 0,186 | 0,182 | 1,02 | 1,90 | 50,00 | 230 | 0,098 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 487 | Default | 14/10/2011 | 10:26 | 12,93 | 0,259 | 0,209 | 1,24 | 9,53 | 50,00 | 230 | 0,027 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 488 | Default | 14/10/2011 | 10:27 | 90,14 | 1,803 | 3,579 | 0,50 | 0,50 | 50,00 | 230 | 3,608 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 489 | Default | 14/10/2011 | 10:30 | 76,34 | 1,667 | 1,846 | 0,85 | 0,82 | 50,00 | 230 | 1,906 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 491 | Default | 14/10/2011 | 10:31 | 46,35 | 0,927 | 1,238 | 0,75 | 0,84 | 50,00 | 230 | 1,103 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 492 | Default | 14/10/2011 | 10:32 | 28,24 | 0,656 | 0,432 | 1,31 | 1,99 | 50,00 | 230 | 0,284 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 493 | Default | 14/10/2011 | 10:33 | 22,05 | 0,441 | 0,363 | 1,21 | 2,36 | 50,00 | 230 | 0,187 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 494 | Default | 14/10/2011 | 10:34 | 53,53 | 1,071 | 0,902 | 1,19 | 1,02 | 50,00 | 230 | 1,048 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 495 | Default | 14/10/2011 | 10:35 | 34,60 | 0,692 | 0,769 | 0,90 | 1,09 | 50,00 | 230 | 0,633 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 497 | Default | 14/10/2011 | 10:36 | 20,65 | 0,413 | 0,322 | 1,28 | 2,68 | 50,00 | 230 | 0,154 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 498 | Default | 14/10/2011 | 10:37 | 20,13 | 0,403 | 0,459 | 0,88 | 1,14 | 50,00 | 230 | 0,354 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 499 | Default | 14/10/2011 | 10:38 | 22,13 | 0,443 | 0,439 | 1,01 | 1,42 | 50,00 | 230 | 0,313 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 500 | Default | 14/10/2011 | 10:39 | 30,61 | 0,612 | 0,527 | 1,16 | 1,35 | 50,00 | 230 | 0,455 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 501 | Default | 14/10/2011 | 10:42 | 53,68 | 1,074 | 1,521 | 0,71 | 0,75 | 50,00 | 230 | 1,435 | Measure | USB2.G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |

APÊNDICE C - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE DEJETOS RESSUSPENDIDAS EM 200 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (502-510) (CONTINUAÇÃO)

| Report | AMOSTRAS-DEJETOS- | Test Type | Nucleic Acid | Date/Time | 28/11/2011 11:07 | Page # | 3 | | | | | | | | |
|-----------|-------------------|------------|--------------|-----------|------------------|--------|---------|---------|----------|-------------|-------------|---------|------------------|------------------|-----------------------|
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A 260 | A 280 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
| 502 | Default | 14/10/2011 | 10:43 | 21,99 | 0,440 | 0,415 | 1,06 | 1,71 | 50,00 | 230 | 0,257 | 0,014 | Measure | USB2.G39487BI647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 503 | Default | 14/10/2011 | 10:44 | 24,30 | 0,486 | 0,357 | 1,36 | 2,76 | 50,00 | 230 | 0,175 | 0,020 | Measure | USB2.G39487BI647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 504 | Default | 14/10/2011 | 10:45 | 32,25 | 0,645 | 0,530 | 1,22 | 1,83 | 50,00 | 230 | 0,353 | 0,067 | Measure | USB2.G39487BI647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 506 | Default | 14/10/2011 | 10:46 | 50,01 | 1,000 | 0,946 | 1,06 | 1,14 | 50,00 | 230 | 0,674 | 0,067 | Measure | USB2.G39487BI647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 507 | Default | 14/10/2011 | 10:47 | 23,54 | 0,471 | 0,418 | 1,13 | 1,02 | 50,00 | 230 | 0,462 | 0,064 | Measure | USB2.G39487BI647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 508 | Default | 14/10/2011 | 10:48 | 20,46 | 0,409 | 0,327 | 1,25 | 1,23 | 50,00 | 230 | 0,332 | 0,012 | Measure | USB2.G39487BI647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 509 | Default | 14/10/2011 | 10:49 | 66,29 | 1,386 | 3,350 | 0,41 | 0,42 | 50,00 | 230 | 3,335 | 0,032 | Measure | USB2.G39487BI647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 510 | Default | 14/10/2011 | 10:50 | 12,32 | 0,246 | 0,200 | 1,23 | 11,88 | 50,00 | 230 | 0,021 | 0,013 | Measure | USB2.G39487BI647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |

APÊNDICE D - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE SANGUE RESSUSPENDIDAS EM 50 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-510)



Report AMOSTRAS-SANGUE-(50)-
2011-11-28
Date/time 28/11/2011 11:12
Nucleic Acid
Test Type

APÊNDICE D - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE SANGUE RESSUSPENDIDAS EM 50 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-446) (CONTINUAÇÃO)

| Report | AMOSTRAS-SANGUE-(90)- | Test_Type | Nucleic Acid | Date/Time | Page # | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------------|------------|--------------|------------------|--------|-------|---------|---------|----------|-------------|-------------|---------|------------------|-----------------|--------------------|
| | | | | 28/11/2011 11:12 | 1 | | | | | | | | | | |
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
| 364 | Default | 26/10/2011 | 09:59 | 150,98 | 3,019 | 1,818 | 1,66 | 0,54 | 50,00 | 230 | 5,633 | 0,324 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 365 | Default | 26/10/2011 | 10:01 | 160,23 | 3,205 | 1,948 | 1,65 | 0,56 | 50,00 | 230 | 5,765 | 0,324 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 366 | Default | 26/10/2011 | 10:03 | 194,83 | 3,897 | 2,414 | 1,61 | 0,49 | 50,00 | 230 | 7,897 | 0,354 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 370 | Default | 26/10/2011 | 10:05 | 222,00 | 4,440 | 2,636 | 1,68 | 0,67 | 50,00 | 230 | 6,660 | 0,234 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 378 | Default | 26/10/2011 | 10:08 | 156,98 | 3,140 | 1,910 | 1,64 | 0,56 | 50,00 | 230 | 5,569 | 0,267 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 379 | Default | 26/10/2011 | 10:10 | 119,00 | 2,380 | 1,445 | 1,65 | 0,54 | 50,00 | 230 | 4,398 | 0,284 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 390 | Default | 26/10/2011 | 10:11 | 103,69 | 2,074 | 1,282 | 1,62 | 0,55 | 50,00 | 230 | 3,802 | 0,330 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 391 | Default | 26/10/2011 | 10:19 | 112,54 | 2,251 | 1,363 | 1,66 | 0,50 | 50,00 | 230 | 4,511 | 0,643 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 396 | Default | 26/10/2011 | 10:21 | 135,74 | 2,715 | 1,691 | 1,60 | 0,55 | 50,00 | 230 | 4,917 | 0,362 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 397 | Default | 26/10/2011 | 10:22 | 141,15 | 2,823 | 1,760 | 1,60 | 0,58 | 50,00 | 230 | 4,861 | 0,403 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 398 | Default | 26/10/2011 | 10:24 | 107,09 | 2,142 | 1,374 | 1,56 | 0,51 | 50,00 | 230 | 4,231 | 0,118 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 399 | Default | 26/10/2011 | 10:26 | 155,53 | 3,111 | 1,927 | 1,61 | 0,52 | 50,00 | 230 | 5,952 | 0,241 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 400 | Default | 26/10/2011 | 10:27 | 147,51 | 2,950 | 1,815 | 1,63 | 0,54 | 50,00 | 230 | 5,423 | 0,227 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 401 | Default | 26/10/2011 | 10:30 | 177,87 | 3,553 | 2,281 | 1,56 | 0,55 | 50,00 | 230 | 6,487 | 0,237 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 402 | Default | 26/10/2011 | 10:32 | 229,86 | 4,597 | 2,786 | 1,65 | 0,68 | 50,00 | 230 | 6,722 | 0,247 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 403 | Default | 26/10/2011 | 10:33 | 141,21 | 2,824 | 1,757 | 1,61 | 0,56 | 50,00 | 230 | 5,057 | 0,227 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 404 | Default | 26/10/2011 | 10:34 | 148,62 | 2,972 | 1,843 | 1,61 | 0,63 | 50,00 | 230 | 4,696 | 0,124 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 405 | Default | 26/10/2011 | 10:35 | 103,14 | 2,063 | 1,316 | 1,57 | 0,45 | 50,00 | 230 | 4,597 | 0,185 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 406 | Default | 26/10/2011 | 10:37 | 131,38 | 2,628 | 1,640 | 1,60 | 0,55 | 50,00 | 230 | 4,792 | 0,203 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 407 | Default | 26/10/2011 | 10:38 | 127,81 | 2,566 | 1,637 | 1,56 | 0,49 | 50,00 | 230 | 5,187 | 0,230 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 420 | Default | 26/10/2011 | 10:40 | 234,55 | 4,691 | 2,813 | 1,67 | 0,61 | 50,00 | 230 | 7,672 | 0,302 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 423 | Default | 26/10/2011 | 10:41 | 101,74 | 2,035 | 1,343 | 1,52 | 0,46 | 50,00 | 230 | 4,469 | 0,604 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 424 | Default | 26/10/2011 | 10:43 | 127,85 | 2,557 | 1,618 | 1,58 | 0,61 | 50,00 | 230 | 4,201 | 0,536 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 425 | Default | 26/10/2011 | 10:44 | 18,94 | 0,379 | 0,233 | 1,62 | 0,23 | 50,00 | 230 | 1,641 | 0,074 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 426 | Default | 26/10/2011 | 10:46 | 110,35 | 2,207 | 1,365 | 1,62 | 0,70 | 50,00 | 230 | 3,154 | 0,098 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 427 | Default | 26/10/2011 | 10:47 | 72,40 | 1,448 | 0,905 | 1,60 | 0,81 | 50,00 | 230 | 1,789 | 0,568 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 436 | Default | 26/10/2011 | 10:49 | 98,38 | 1,968 | 1,262 | 1,56 | 0,82 | 50,00 | 230 | 2,395 | 0,142 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 437 | Default | 26/10/2011 | 10:50 | 141,18 | 2,824 | 1,724 | 1,64 | 0,91 | 50,00 | 230 | 3,097 | 0,383 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 438 | Default | 26/10/2011 | 10:52 | 128,49 | 2,570 | 1,557 | 1,64 | 0,77 | 50,00 | 230 | 3,356 | 0,183 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |
| 446 | Default | 26/10/2011 | 10:53 | 66,70 | 1,394 | 0,945 | 1,48 | 0,52 | 50,00 | 230 | 2,691 | 0,198 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,5711216 |

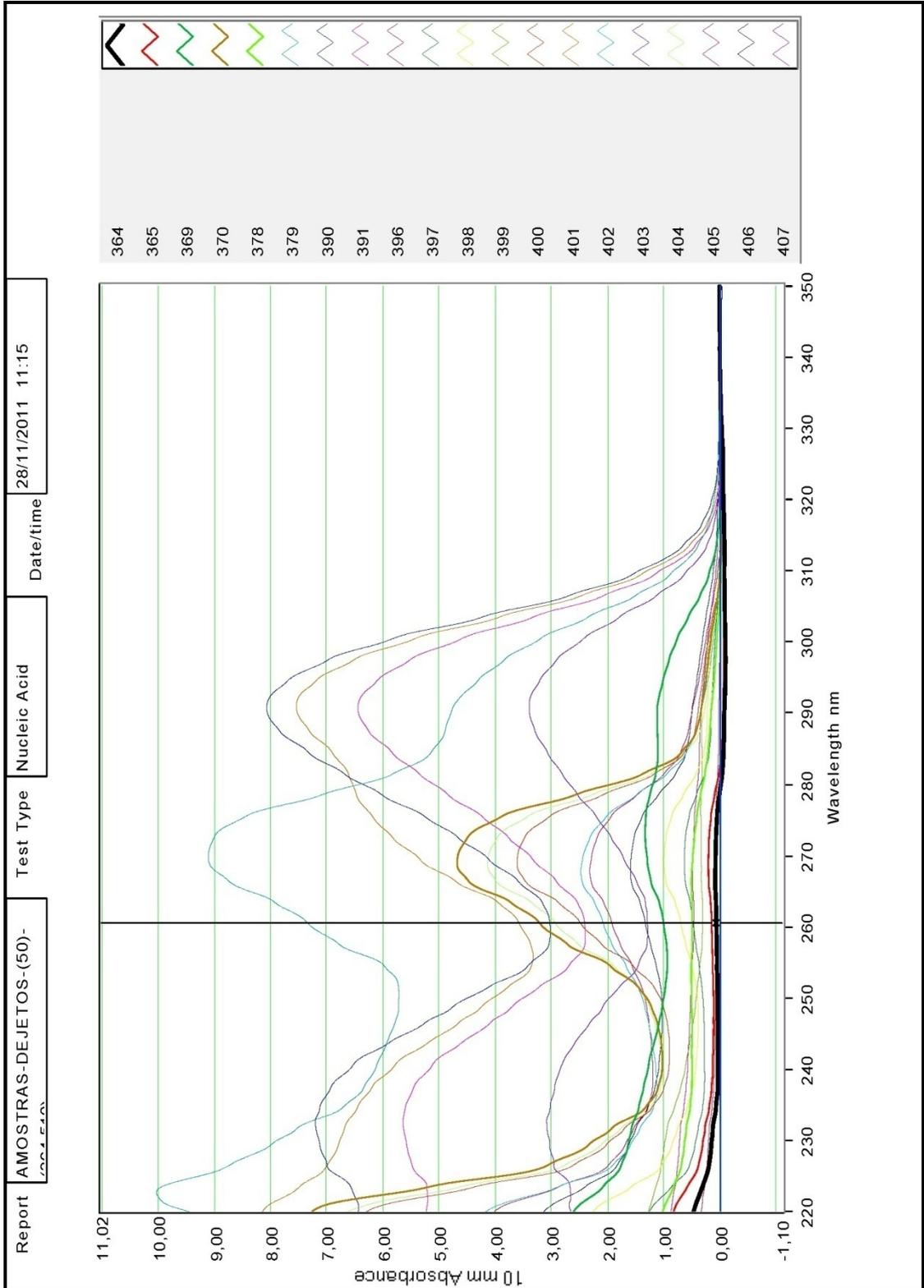
APÊNDICE D - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE SANGUE RESSUSPENDIDAS EM 50 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (447-501) (CONTINUAÇÃO)

| Report | AMOSTRAS-SANGUE-(90)- | Test_Type | Nucleic Acid | Date/Time | Page # | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------------|------------|--------------|-----------|--------|-------|---------|---------|----------|-------------|-------------|---------|------------------|-----------------|-----------------------|
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
| 447 | Default | 26/10/2011 | 10:57 | 70,42 | 1,408 | 0,899 | 1,58 | 0,86 | 50,00 | 230 | 1,640 | 0,055 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 448 | Default | 26/10/2011 | 10:58 | 104,78 | 2,086 | 1,475 | 1,42 | 0,52 | 50,00 | 230 | 4,020 | 0,139 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 449 | Default | 26/10/2011 | 10:59 | 28,91 | 0,578 | 0,360 | 1,58 | 0,81 | 50,00 | 230 | 0,718 | 0,046 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 450 | Default | 26/10/2011 | 11:03 | 70,38 | 1,408 | 0,894 | 1,57 | 0,78 | 50,00 | 230 | 1,795 | 0,115 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 457 | Default | 26/10/2011 | 11:05 | 214,81 | 4,292 | 2,684 | 1,60 | 0,53 | 50,00 | 230 | 8,105 | 0,528 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 467 | Default | 26/10/2011 | 11:06 | 61,24 | 1,225 | 0,768 | 1,60 | 0,79 | 50,00 | 230 | 1,649 | 0,121 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 468 | Default | 26/10/2011 | 11:07 | 65,15 | 1,303 | 0,799 | 1,63 | 0,45 | 50,00 | 230 | 2,926 | -0,805 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 469 | Default | 26/10/2011 | 11:08 | 74,59 | 1,492 | 0,925 | 1,61 | 0,96 | 50,00 | 230 | 1,546 | 0,033 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 471 | Default | 26/10/2011 | 11:10 | 60,83 | 1,217 | 0,765 | 1,59 | 0,87 | 50,00 | 230 | 1,403 | 0,113 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 472 | Default | 26/10/2011 | 11:14 | 30,45 | 0,609 | 0,377 | 1,62 | 0,93 | 50,00 | 230 | 0,655 | 0,039 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 473 | Default | 26/10/2011 | 11:15 | 30,10 | 0,602 | 0,377 | 1,60 | 0,63 | 50,00 | 230 | 0,950 | 0,111 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 474 | Default | 26/10/2011 | 11:16 | 63,69 | 1,274 | 0,775 | 1,64 | 0,69 | 50,00 | 230 | 1,868 | -0,232 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 475 | Default | 26/10/2011 | 11:17 | 30,78 | 0,616 | 0,385 | 1,60 | 0,50 | 50,00 | 230 | 1,242 | 0,068 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 477 | Default | 26/10/2011 | 11:20 | 78,12 | 1,562 | 0,987 | 1,58 | 0,79 | 50,00 | 230 | 1,974 | 0,122 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 479 | Default | 26/10/2011 | 11:22 | 181,58 | 3,632 | 2,278 | 1,59 | 0,61 | 50,00 | 230 | 5,978 | 0,170 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 480 | Default | 26/10/2011 | 11:23 | 43,56 | 0,871 | 0,536 | 1,63 | 0,10 | 50,00 | 230 | 9,131 | 0,043 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 481 | Default | 26/10/2011 | 11:24 | 47,54 | 0,951 | 0,550 | 1,73 | 0,07 | 50,00 | 230 | 13,686 | 0,114 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 487 | Default | 26/10/2011 | 11:26 | 58,30 | 1,166 | 0,672 | 1,73 | 0,09 | 50,00 | 230 | 13,500 | 0,037 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 488 | Default | 26/10/2011 | 11:27 | 143,47 | 2,869 | 1,628 | 1,76 | 0,22 | 50,00 | 230 | 13,041 | -0,389 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 489 | Default | 26/10/2011 | 11:28 | 179,41 | 3,588 | 2,015 | 1,78 | 0,28 | 50,00 | 230 | 12,611 | 0,228 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 491 | Default | 26/10/2011 | 11:30 | 107,02 | 2,140 | 1,244 | 1,72 | 0,15 | 50,00 | 230 | 14,594 | 0,276 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 492 | Default | 26/10/2011 | 11:31 | 62,05 | 1,241 | 0,681 | 1,82 | 0,10 | 50,00 | 230 | 12,984 | 0,246 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 493 | Default | 26/10/2011 | 11:32 | 41,09 | 0,822 | 0,401 | 2,05 | 0,07 | 50,00 | 230 | 11,614 | 0,236 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 494 | Default | 26/10/2011 | 11:33 | 64,38 | 1,288 | 0,712 | 1,81 | 0,11 | 50,00 | 230 | 12,082 | 0,264 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 495 | Default | 26/10/2011 | 11:34 | 147,75 | 2,965 | 1,695 | 1,74 | 0,20 | 50,00 | 230 | 14,493 | 0,152 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 497 | Default | 26/10/2011 | 11:35 | 176,14 | 3,523 | 1,915 | 1,84 | 0,30 | 50,00 | 230 | 11,826 | 0,266 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 498 | Default | 26/10/2011 | 11:36 | 119,23 | 2,385 | 1,377 | 1,73 | 0,17 | 50,00 | 230 | 13,726 | 0,185 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 499 | Default | 26/10/2011 | 11:37 | 158,38 | 3,168 | 1,785 | 1,77 | 0,23 | 50,00 | 230 | 14,047 | 0,271 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 500 | Default | 26/10/2011 | 11:38 | 67,66 | 1,353 | 0,740 | 1,83 | 0,11 | 50,00 | 230 | 12,414 | 0,295 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 501 | Default | 26/10/2011 | 11:39 | 124,58 | 2,492 | 1,408 | 1,77 | 0,19 | 50,00 | 230 | 13,424 | 0,271 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |

APÊNDICE D - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE SANGUE RESSUSPENDIDAS EM 50 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (502-510) (CONTINUAÇÃO)

| Report | | AMOSTRAS-SANGUE-(50)- | | Test Type | | Nucleic Acid | | Date/Time | | 28/11/2011 11:12 | | Page # 3 | | | |
|-----------|---------|-----------------------|-------|-----------|-------|--------------|---------|-----------|----------|------------------|-------------|----------|------------------|-----------------|-----------------------|
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
| 502 | Default | 26/10/2011 | 11:41 | 82,79 | 1,656 | 0,922 | 1,80 | 0,14 | 50,00 | 230 | 11,743 | 0,189 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 503 | Default | 26/10/2011 | 11:42 | 51,77 | 1,035 | 0,506 | 2,05 | 0,08 | 50,00 | 230 | 12,202 | 0,323 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 504 | Default | 26/10/2011 | 11:43 | 65,92 | 1,318 | 0,750 | 1,74 | 0,12 | 50,00 | 230 | 11,095 | 0,169 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 506 | Default | 26/10/2011 | 11:44 | 57,08 | 1,142 | 0,562 | 2,03 | 0,10 | 50,00 | 230 | 11,249 | 0,204 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 507 | Default | 26/10/2011 | 11:45 | 60,53 | 1,211 | 0,644 | 1,88 | 0,11 | 50,00 | 230 | 11,095 | 0,219 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 508 | Default | 26/10/2011 | 11:46 | 208,85 | 4,177 | 2,305 | 1,81 | 0,33 | 50,00 | 230 | 12,603 | 0,182 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 510 | Default | 26/10/2011 | 11:47 | 25,75 | 0,515 | 0,260 | 1,98 | 0,07 | 50,00 | 230 | 7,476 | 0,172 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 425-2 | Default | 26/10/2011 | 11:48 | 17,41 | 0,348 | 0,215 | 1,62 | 0,23 | 50,00 | 230 | 1,484 | 0,070 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |
| 510-2 | Default | 26/10/2011 | 11:50 | 26,55 | 0,531 | 0,284 | 1,87 | 0,07 | 50,00 | 230 | 7,152 | 0,170 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57/11/2/16 |

APÊNDICE E - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE DEJETOS RESSUSPENDIDAS EM 50 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-510)



APÊNDICE E - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE DEJETOS RESSUSPENDIDAS EM 50 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (364-446) (CONTINUAÇÃO)

| Report | A MOSTRAS-DEJETOS-(60)- LABOR | Test Type | Nucleic Acid | Date/time | 28/11/2011 11:15 | Page # | 1 | | | | | | | | |
|-----------|----------------------------------|------------|--------------|-----------|------------------|--------|---------|---------|----------|-------------|-------------|---------|------------------|-----------------|---------------------|
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
| 364 | Default | 31/10/2011 | 08:06 | 2,99 | 0,060 | -0,017 | -3,43 | 0,41 | 50,00 | 230 | 0,146 | 0,139 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 365 | Default | 31/10/2011 | 08:08 | 7,32 | 0,146 | 0,055 | 2,87 | 0,49 | 50,00 | 230 | 0,299 | 0,159 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 366 | Default | 31/10/2011 | 08:09 | 49,82 | 0,999 | 1,195 | 0,83 | 0,61 | 50,00 | 230 | 1,621 | 0,493 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 370 | Default | 31/10/2011 | 08:10 | 157,57 | 3,151 | 1,937 | 1,63 | 1,41 | 50,00 | 230 | 2,240 | 0,218 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 378 | Default | 31/10/2011 | 08:11 | 24,57 | 0,491 | 0,305 | 1,61 | 0,79 | 50,00 | 230 | 0,625 | 0,223 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 379 | Default | 31/10/2011 | 08:12 | 363,30 | 7,266 | 6,415 | 1,13 | 0,92 | 50,00 | 230 | 7,883 | 0,812 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 390 | Default | 31/10/2011 | 08:13 | 161,08 | 3,022 | 6,350 | 0,48 | 0,42 | 50,00 | 230 | 7,134 | 0,571 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 391 | Default | 31/10/2011 | 08:14 | 120,13 | 2,403 | 5,087 | 0,47 | 0,43 | 50,00 | 230 | 5,588 | 0,280 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 396 | Default | 31/10/2011 | 08:15 | 3,02 | 0,060 | 0,050 | 1,21 | 0,30 | 50,00 | 230 | 0,203 | 0,110 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 397 | Default | 31/10/2011 | 08:16 | 23,46 | 0,469 | 0,345 | 1,36 | 1,08 | 50,00 | 230 | 0,430 | 0,061 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 398 | Default | 31/10/2011 | 08:17 | 34,24 | 0,685 | 0,536 | 1,28 | 0,83 | 50,00 | 230 | 0,829 | 0,114 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 399 | Default | 31/10/2011 | 08:17 | 15,38 | 0,308 | 0,324 | 0,95 | 0,31 | 50,00 | 230 | 0,977 | 0,223 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 400 | Default | 31/10/2011 | 08:18 | 121,82 | 2,426 | 1,599 | 1,52 | 1,25 | 50,00 | 230 | 1,948 | 0,180 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 401 | Default | 31/10/2011 | 08:19 | 177,09 | 3,542 | 6,536 | 0,54 | 0,52 | 50,00 | 230 | 6,765 | 0,239 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 402 | Default | 31/10/2011 | 08:20 | 102,97 | 2,059 | 1,209 | 1,70 | 1,33 | 50,00 | 230 | 1,550 | 0,298 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 403 | Default | 31/10/2011 | 08:21 | 84,23 | 1,285 | 2,672 | 0,48 | 0,42 | 50,00 | 230 | 3,031 | 7,222 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 404 | Default | 31/10/2011 | 08:22 | 144,06 | 2,881 | 1,720 | 1,87 | 1,42 | 50,00 | 230 | 2,032 | 0,379 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 405 | Default | 31/10/2011 | 08:23 | 95,23 | 1,905 | 1,228 | 1,55 | 1,15 | 50,00 | 230 | 1,650 | 0,299 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 406 | Default | 31/10/2011 | 08:24 | 65,79 | 1,316 | 0,937 | 1,40 | 0,83 | 50,00 | 230 | 1,591 | 0,766 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 407 | Default | 31/10/2011 | 08:25 | 23,51 | 0,466 | 0,397 | 1,17 | 0,65 | 50,00 | 230 | 0,717 | 0,163 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 420 | Default | 31/10/2011 | 08:26 | 20,11 | 0,402 | 0,299 | 1,34 | 0,58 | 50,00 | 230 | 0,690 | 0,193 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 423 | Default | 31/10/2011 | 08:27 | 77,56 | 1,551 | 1,338 | 1,16 | 0,79 | 50,00 | 230 | 1,980 | 0,331 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 424 | Default | 31/10/2011 | 08:28 | 90,88 | 1,818 | 1,167 | 1,86 | 0,98 | 50,00 | 230 | 1,847 | 0,668 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 425 | Default | 31/10/2011 | 08:29 | 153,70 | 3,074 | 6,749 | 0,46 | 0,43 | 50,00 | 230 | 7,152 | 0,344 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 426 | Default | 31/10/2011 | 08:30 | 67,90 | 1,368 | 1,091 | 0,80 | 0,65 | 50,00 | 230 | 2,090 | 0,228 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 427 | Default | 31/10/2011 | 08:30 | 35,68 | 0,714 | 0,619 | 1,15 | 0,77 | 50,00 | 230 | 0,932 | 0,204 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 436 | Default | 31/10/2011 | 08:31 | 99,29 | 1,986 | 1,311 | 1,51 | 1,28 | 50,00 | 230 | 1,553 | 0,212 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 437 | Default | 31/10/2011 | 08:32 | 128,90 | 2,578 | 1,844 | 1,57 | 1,48 | 50,00 | 230 | 1,747 | 0,208 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 438 | Default | 31/10/2011 | 08:33 | 51,52 | 1,030 | 0,750 | 1,37 | 0,96 | 50,00 | 230 | 1,074 | -0,167 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 446 | Default | 31/10/2011 | 08:34 | 211,91 | 4,238 | 2,806 | 1,83 | 1,16 | 50,00 | 230 | 3,644 | 0,601 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |

APÊNDICE E - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE DEJETOS RESSUSPENDIDAS EM 50 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (447-501) (CONTINUAÇÃO)

| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
|-----------|---------|------------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|----------|-------------|-------------|---------|------------------|-----------------|---------------------|
| 447 | Default | 31/10/2011 | 08:35 | 257,51 | 5,150 | 2,886 | 1,72 | 1,82 | 50,00 | 230 | 3,174 | -0,532 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 448 | Default | 31/10/2011 | 08:36 | 233,33 | 0,487 | 0,278 | 1,88 | 0,88 | 50,00 | 230 | 0,532 | 0,269 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 449 | Default | 31/10/2011 | 08:37 | 43,24 | 0,865 | 0,553 | 1,56 | 0,87 | 50,00 | 230 | 0,993 | 0,232 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 450 | Default | 31/10/2011 | 08:38 | 176,59 | 3,532 | 5,227 | 0,68 | 0,65 | 50,00 | 230 | 5,420 | 0,272 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 457 | Default | 31/10/2011 | 08:39 | 45,84 | 0,917 | 0,684 | 1,34 | 0,78 | 50,00 | 230 | 1,183 | 0,307 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 467 | Default | 31/10/2011 | 08:40 | 59,40 | 1,188 | 0,749 | 1,59 | 1,22 | 50,00 | 230 | 0,973 | 0,211 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 468 | Default | 31/10/2011 | 08:41 | 114,78 | 2,296 | 1,435 | 1,60 | 1,24 | 50,00 | 230 | 1,857 | 0,327 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 469 | Default | 31/10/2011 | 08:42 | 180,49 | 3,210 | 2,073 | 1,55 | 1,05 | 50,00 | 230 | 3,068 | 1,023 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 471 | Default | 31/10/2011 | 08:43 | 182,32 | 3,646 | 3,828 | 0,95 | 0,99 | 50,00 | 230 | 4,117 | 0,328 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 472 | Default | 31/10/2011 | 08:44 | 206,36 | 4,127 | 8,656 | 0,48 | 0,46 | 50,00 | 230 | 8,958 | 0,331 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 473 | Default | 31/10/2011 | 08:46 | 96,25 | 1,925 | 1,199 | 1,61 | 1,39 | 50,00 | 230 | 1,386 | 0,267 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 474 | Default | 31/10/2011 | 08:46 | 89,83 | 1,397 | 0,850 | 1,63 | 1,00 | 50,00 | 230 | 1,398 | -0,600 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 475 | Default | 31/10/2011 | 08:47 | 126,11 | 2,522 | 1,480 | 1,70 | 0,94 | 50,00 | 230 | 2,697 | 0,704 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 477 | Default | 31/10/2011 | 08:48 | 764,22 | 16,284 | 38,620 | 0,40 | 0,38 | 50,00 | 230 | 40,292 | 1,957 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 479 | Default | 31/10/2011 | 08:51 | 343,91 | 6,878 | 11,233 | 0,61 | 0,69 | 50,00 | 230 | 11,755 | 0,599 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 480 | Default | 31/10/2011 | 08:51 | 154,78 | 3,066 | 3,446 | 0,90 | 0,56 | 50,00 | 230 | 5,521 | 1,780 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 481 | Default | 31/10/2011 | 08:52 | 123,90 | 2,478 | 3,249 | 0,76 | 0,59 | 50,00 | 230 | 4,190 | 0,474 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 487 | Default | 31/10/2011 | 08:53 | 25,74 | 0,615 | 0,508 | 1,01 | 0,50 | 50,00 | 230 | 1,039 | 0,444 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 488 | Default | 31/10/2011 | 08:55 | 241,99 | 4,840 | 3,165 | 1,53 | 1,20 | 50,00 | 230 | 4,029 | 0,657 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 489 | Default | 31/10/2011 | 08:56 | 822,74 | 12,455 | 23,993 | 0,52 | 0,49 | 50,00 | 230 | 25,021 | 1,107 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 491 | Default | 31/10/2011 | 08:57 | 358,04 | 7,173 | 10,177 | 0,70 | 0,70 | 50,00 | 230 | 10,270 | 0,449 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 492 | Default | 31/10/2011 | 08:58 | 81,89 | 1,638 | 1,298 | 1,26 | 1,02 | 50,00 | 230 | 1,602 | 0,263 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 493 | Default | 31/10/2011 | 08:58 | 278,99 | 5,580 | 6,210 | 0,90 | 0,85 | 50,00 | 230 | 6,601 | 0,530 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 494 | Default | 31/10/2011 | 10:00 | 681,44 | 13,629 | 24,128 | 0,56 | 0,53 | 50,00 | 230 | 25,654 | 1,401 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 495 | Default | 31/10/2011 | 10:00 | 220,27 | 4,405 | 2,935 | 1,50 | 1,22 | 50,00 | 230 | 3,618 | 0,399 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 497 | Default | 31/10/2011 | 10:02 | 198,98 | 3,974 | 3,360 | 1,18 | 0,93 | 50,00 | 230 | 4,252 | 0,373 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 498 | Default | 31/10/2011 | 10:02 | 174,72 | 3,494 | 4,584 | 0,76 | 0,67 | 50,00 | 230 | 5,200 | 0,547 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 499 | Default | 31/10/2011 | 10:03 | 250,28 | 5,006 | 3,317 | 1,51 | 1,18 | 50,00 | 230 | 4,330 | 0,439 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 500 | Default | 31/10/2011 | 10:04 | 228,73 | 4,575 | 3,052 | 1,50 | 1,10 | 50,00 | 230 | 4,150 | 0,806 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 501 | Default | 31/10/2011 | 10:05 | 542,53 | 10,951 | 18,212 | 0,60 | 0,61 | 50,00 | 230 | 17,746 | 0,767 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,57112/16 |

APÊNDICE E - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE DNA DE DEJETOS RESSUSPENDIDAS EM 50 µL DE T.E (1 mM Tris-HCl / 0,1 mM EDTA, pH 8.0) (502-510) (CONTINUAÇÃO)

| Report | | AMOSTRAS-DEJETOS-(60)- | | Test Type | | Nucleic Acid | | Date/time | | 28/11/2011 11:15 | | Page # | | 3 | |
|-----------|---------|------------------------|-------|-----------|-------|--------------|---------|-----------|----------|------------------|-------------|---------|------------------|-----------------|---------------------|
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
| 502 | Default | 31/10/2011 | 10:07 | 130,14 | 2,603 | 1,722 | 1,51 | 1,34 | 50,00 | 230 | 1,941 | 0,175 | Measure | USB2G39487BI647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 503 | Default | 31/10/2011 | 10:08 | 193,31 | 3,886 | 2,300 | 1,68 | 1,41 | 50,00 | 230 | 2,760 | 0,317 | Measure | USB2G39487BI647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 504 | Default | 31/10/2011 | 10:09 | 289,96 | 5,799 | 4,346 | 1,33 | 1,14 | 50,00 | 230 | 5,070 | 0,482 | Measure | USB2G39487BI647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 505 | Default | 31/10/2011 | 10:10 | 380,54 | 7,611 | 5,603 | 1,36 | 1,20 | 50,00 | 230 | 6,320 | 0,464 | Measure | USB2G39487BI647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 507 | Default | 31/10/2011 | 10:10 | 306,73 | 6,135 | 3,651 | 1,68 | 1,36 | 50,00 | 230 | 4,500 | 0,600 | Measure | USB2G39487BI647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 508 | Default | 31/10/2011 | 10:11 | 254,15 | 5,083 | 2,886 | 1,76 | 1,56 | 50,00 | 230 | 3,263 | 0,249 | Measure | USB2G39487BI647 | 1,000088/0,57112/16 |
| 510 | Default | 31/10/2011 | 10:12 | 184,18 | 3,684 | 3,069 | 1,20 | 1,02 | 50,00 | 230 | 3,608 | 0,566 | Measure | USB2G39487BI647 | 1,000088/0,57112/16 |

APÊNDICE F – ACHADOS DE QUANTIDADE DE DNA TOTAL EM REAÇÃO DE PCR

Foto de gel de agarose a 1,5% revelado com Brometo de etídio (1mg/mL). Resultado de PCR-Multiplex com iniciadores 121/122 e DIAZ-7/DIAZ-8 (para amplificação do fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto e do fragmento de 195 pb do DNA nuclear, respectivamente) e volumes distintos de solução de DNA molde (20, 25 e 30µL) de amostra de sangue. Amostra (proveniente de uma mesma origem) positiva para os três testes sorológicos, xenodiagnóstico, PCR para solução de DNA molde extraído de sangue total + guanidina / HCl + EDTA e solução de dejetos de triatomíneos.

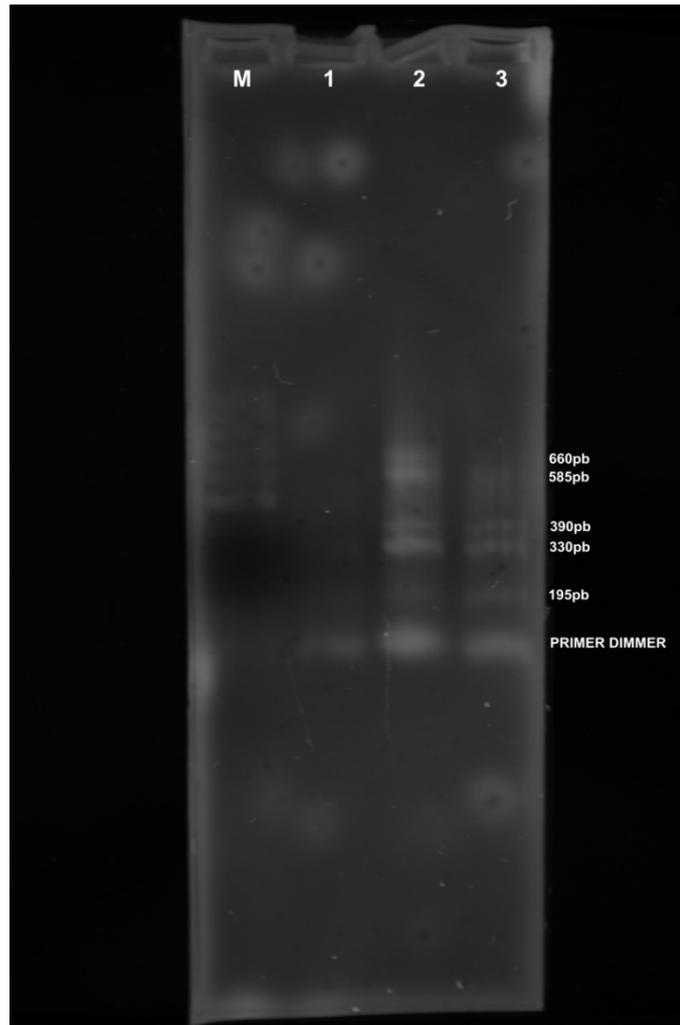
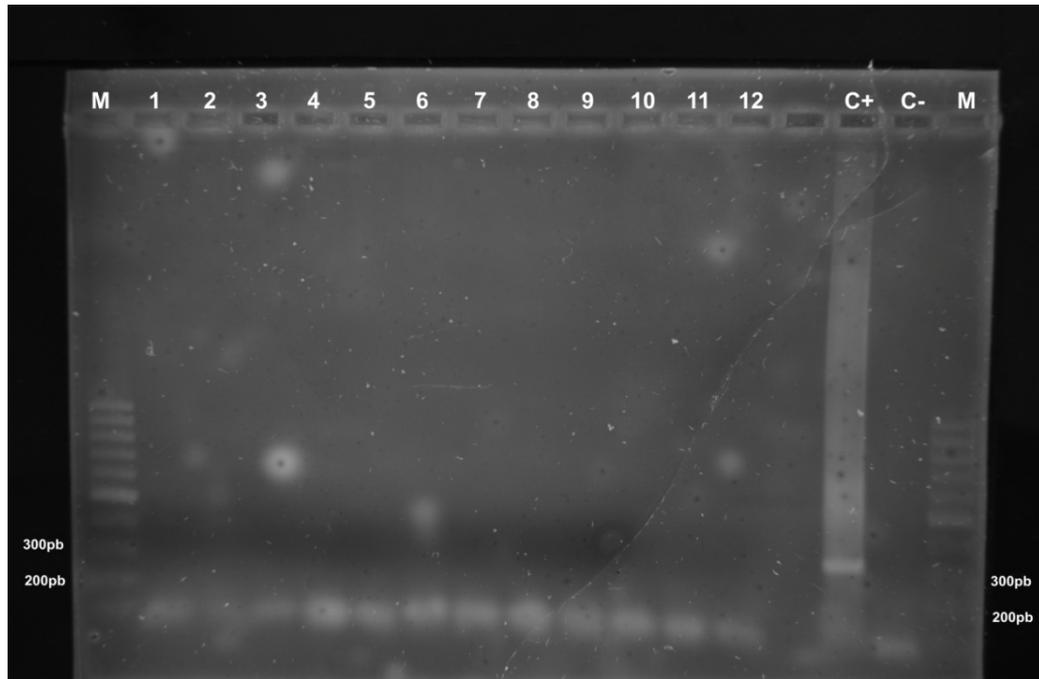


Tabela com valores de volume de solução de DNA molde em relação a concentração e massa total na reação de PCR. Amostras 1, 2 e 3 correspondem a um mesmo material (DNA molde extraído de sangue) do paciente 477.

| Amostra | Volume(µL) | Concentração (gn/µL) | Massa (ng) |
|---------|------------|----------------------|------------|
| 1 | 20,00 | 38,00 | 760,00 |
| 2 | 25,00 | 38,00 | 950,00 |
| 3 | 30,00 | 38,00 | 1140,00 |

APÊNDICE G – AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE VOLUME MÁXIMO DE SOLUÇÃO DE DNA MOLDE NO PCR (1 a 12)

Foto de gel de agarose a 1,5% revelado com Brometo de etídio (1mg/mL). Resultado de PCR-Multiplex com iniciadores 121/122 e DIAZ-7/DIAZ-8 (para amplificação do fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto e do fragmento de 195 pb do DNA nuclear, respectivamente) e volume máximo útil, na reação de PCR-Multiplex, de solução de DNA molde (25µL) de amostra do sangue.

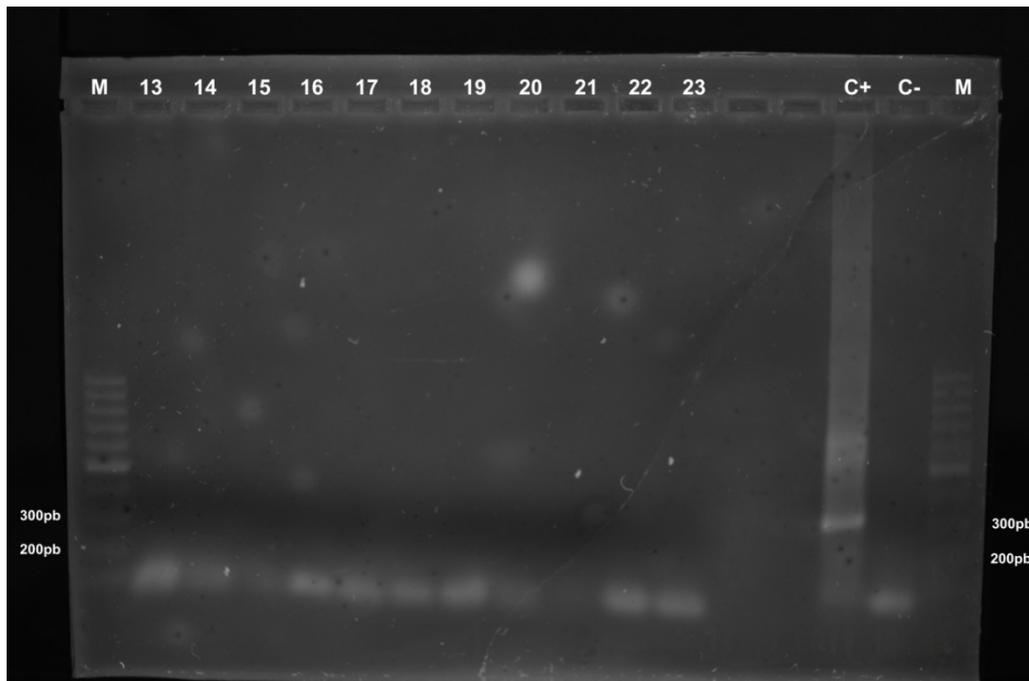


Valores de volume de solução de DNA molde em relação a concentração e massa total na reação de PCR-Multiplex. Amostras 1 a 12, C+ (DNA de cultura de *T. cruzi*) e C- (DNA de cultura de *L. chagasi*).

| Amostra | Volume (µL) | Concentração (ng/µL) | Massa (ng) |
|---------|-------------|----------------------|------------|
| 1 | 25 | 150,9 | 3774,00 |
| 2 | 25 | 160,23 | 4005,75 |
| 3 | 25 | 194,83 | 4870,75 |
| 4 | 25 | 222,00 | 5550,00 |
| 5 | 25 | 156,98 | 3924,50 |
| 6 | 25 | 119,00 | 2975,00 |
| 7 | 25 | 103,69 | 2592,25 |
| 8 | 25 | 112,54 | 2813,50 |
| 9 | 25 | 135,74 | 3393,50 |
| 10 | 25 | 141,15 | 3528,75 |
| 11 | 25 | 107,09 | 2677,25 |
| 12 | 25 | 155,53 | 3888,25 |
| C+ | 10 | 429,24 | 4292,40 |
| C- | 10 | 36,11 | 361,10 |

APÊNDICE H – AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE VOLUME MÁXIMO DE SOLUÇÃO DE DNA MOLDE NO PCR (13 a 23)

Foto de gel de agarose a 1,5% revelado com Brometo de etídio (1mg/mL). Resultado de PCR com iniciadores 121/122 e DIAZ-7/DIAZ-8 (para amplificação do fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto e do fragmento de 195 pb do DNA nuclear) e volume máximo útil, na reação de PCR-Multiplex, de solução de DNA molde (25µL) de amostra do sangue.

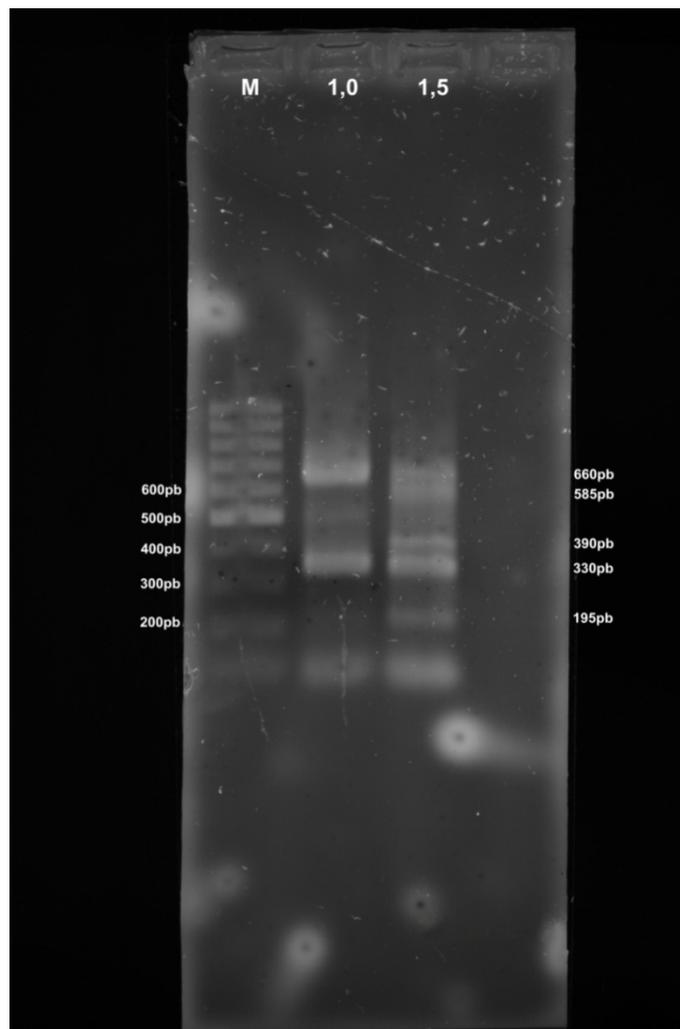


Valores de volume de solução de DNA molde em relação a concentração e massa total na reação de PCR-Multiplex. Amostras 13 a 23, C+ (DNA de cultura de *T. cruzi*) e C- (DNA de cultura de *L. chagasi*).

| Amostra | Volume (µL) | Concentração (ng/µL) | Massa (ng) |
|---------|-------------|----------------------|------------|
| 13 | 25 | 147,51 | 3687,75 |
| 14 | 25 | 177,67 | 4441,75 |
| 15 | 25 | 229,86 | 5746,50 |
| 16 | 25 | 141,21 | 3530,25 |
| 17 | 25 | 148,62 | 3715,50 |
| 18 | 25 | 103,14 | 2578,50 |
| 19 | 25 | 131,38 | 3282,00 |
| 20 | 25 | 127,81 | 3195,25 |
| 21 | 25 | 234,55 | 5863,75 |
| 22 | 25 | 101,74 | 2543,50 |
| 23 | 25 | 127,85 | 3196,25 |
| C+ | 10 | 429,24 | 4292,40 |
| C- | 10 | 36,11 | 361,10 |

APÊNDICE I – ACHADOS DAS QUANTIDADES DE INICIADORES POR REAÇÃO DE PCR

Foto de gel de agarose a 1,5% revelado com Brometo de etídio (1mg/mL). Resultado de PCR-Multiplex com iniciadores 121/122 e DIAZ-7/DIAZ-8 (para amplificação do fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto e do fragmento de 195 pb do DNA nuclear, respectivamente), a 20pmo,l em volumes distintos administrados (1,0 e 1,5µL). Amostra (proveniente de uma mesma origem) positiva para os três teste sorológicos (HI, IFI e ELISA), xenodiagnóstico, PCR para solução de DNA molde extraído de sangue total + guanidina / HCl + EDTA (metodologia *in house* e por kit comercial) e solução de dejetos de triatomíneos (metodologia *in house*) (paciente 477). Massa total de DNA molde igual a 950 ng.



APÊNDICE J – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS (AMOSTRAS 1 A 34)

Classificação numérica (C.N) da amostras com referência ao número de ordem do paciente (N.O), a tipologia sorológica, ao Sexo (M – Masculino ou F - Feminino), Idade, Procedência e Macrorregião estadual (mapa das macrorregiões de planejamento – ANEXO B). Amostras 1 a 34.

| C.N. | N.O. | Sorologia | Sexo | Idade | Procedência | Macrorregião |
|------|------|-----------|------|-------|----------------------------|--------------|
| 1 | 364 | NEG | M | 40 | Tamboril-CE | 4 |
| 2 | 365 | NEG | M | 58 | Guaiuba-CE | 1 |
| 3 | 369 | POS | F | 56 | Russas-CE | 7 |
| 4 | 370 | POS | M | 54 | Quixeré-CE | 7 |
| 5 | 378 | POS | F | 58 | Palhano-CE | 7 |
| 6 | 379 | POS | F | 47 | Tamboril-CE | 4 |
| 7 | 390 | POS | M | 34 | Independência-CE | 4 |
| 8 | 391 | POS | F | 42 | Limoeiro do Norte-CE | 7 |
| 9 | 396 | POS | M | 60 | Quixereé-CE | 7 |
| 10 | 397 | POS | M | 61 | Acopiara-CE | 8 |
| 11 | 398 | POS | F | 30 | Morada Nova-CE | 7 |
| 12 | 399 | POS | M | 62 | Fortaleza-CE | 1 |
| 13 | 400 | POS | M | 42 | Solonópole-CE | 5 |
| 14 | 401 | POS | F | 57 | Quixeré-CE | 7 |
| 15 | 402 | POS | M | 55 | Crateus-CE | 4 |
| 16 | 403 | POS | F | 54 | Fortaleza-CE | 1 |
| 17 | 404 | POS | F | 57 | Icó-CE | 8 |
| 18 | 405 | POS | M | 60 | Orós-CE | 8 |
| 19 | 406 | POS | M | 69 | Fortaleza-CE | 1 |
| 20 | 407 | NEG | F | 66 | Fortaleza-CE | 1 |
| 21 | 420 | POS | M | 63 | Fortaleza-CE | 1 |
| 22 | 423 | POS | M | 42 | Guaramiranga-CE | 6 |
| 23 | 424 | POS | M | 47 | Ocara-CE | 6 |
| 24 | 425 | POS | F | 46 | Limoeiro do Norte-CE | 7 |
| 25 | 426 | POS | M | 83 | Fortaleza-CE | 1 |
| 26 | 427 | POS | M | 40 | Quixeré-CE | 7 |
| 27 | 436 | POS | M | 43 | Tabuleiro do Norte-CE | 7 |
| 28 | 437 | POS | F | 31 | Jaguaruana-CE | 7 |
| 29 | 438 | POS | F | 44 | Fortaleza-CE | 1 |
| 30 | 446 | IND | M | 63 | São Gonçalo do Amarante-CE | 1 |
| 31 | 447 | POS | F | 56 | Aracoiaba-CE | 6 |
| 32 | 448 | POS | F | 58 | Baturité-CE | 6 |
| 33 | 449 | POS | F | 40 | Russas-CE | 7 |
| 34 | 450 | POS | M | 56 | Quixeré-CE | 7 |

POS – Positivo, IND – Indeterminado e NEG - Negativo

APÊNDICE K – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS (AMOSTRAS 35 A 67)

Classificação numérica (C.N) da amostras com referência ao número de ordem do paciente (N.O), a tipologia sorológica, ao Sexo (M – Masculino ou F - Feminino), Idade, Procedência e Macrorregião estadual (mapa das macrorregiões de planejamento – ANEXO B). Amostras 35 a 67.

| C.N. | N.O. | Sorologia | Sexo | Idade | Procedência | Macrorregião |
|------|------|-----------|------|-------|-----------------------|--------------|
| 35 | 457 | POS | F | 43 | Russas-CE | 7 |
| 36 | 467 | POS | F | 56 | Russas-CE | 7 |
| 37 | 468 | POS | M | 48 | Quixeré-CE | 7 |
| 38 | 469 | POS | F | 59 | Jaguaruana-CE | 7 |
| 39 | 471 | POS | F | 47 | Limoeiro do Norte-CE | 7 |
| 40 | 472 | POS | M | 48 | Russas-CE | 7 |
| 41 | 473 | IND | M | 32 | Fortaleza-CE | 1 |
| 42 | 474 | POS | F | 26 | Jagaretama-CE | 7 |
| 43 | 475 | NEG | F | 24 | Russas-CE | 7 |
| 44 | 477 | POS | M | 69 | Icó-CE | 8 |
| 45 | 479 | POS | M | 44 | Quixadá-CE | 5 |
| 46 | 480 | POS | F | 41 | Novo Horizonte-CE | 4 |
| 47 | 481 | POS | F | 58 | Limoeiro do Norte-CE | 7 |
| 48 | 487 | POS | F | 44 | Independência-CE | 4 |
| 49 | 488 | POS | M | 63 | Russas-CE | 7 |
| 50 | 489 | POS | M | 58 | Fortaleza-CE | 1 |
| 51 | 491 | POS | F | 31 | Morada Nova-CE | 7 |
| 52 | 492 | POS | F | 41 | Limoeiro do Norte-CE | 7 |
| 53 | 493 | POS | F | 39 | Russas-CE | 7 |
| 54 | 494 | POS | M | 27 | Canindé-CE | 5 |
| 55 | 495 | POS | F | 67 | Independência-CE | 4 |
| 56 | 497 | POS | M | 31 | Crateus-CE | 4 |
| 57 | 498 | NEG | M | 37 | Baturité-CE | 6 |
| 58 | 499 | POS | M | 37 | Independência-CE | 4 |
| 59 | 500 | POS | F | 47 | Independência-CE | 4 |
| 60 | 501 | POS | M | 46 | Limoeiro do Norte-CE | 7 |
| 61 | 502 | POS | M | 55 | Baturité-CE | 6 |
| 62 | 503 | POS | M | 27 | Tabuleiro do Norte-CE | 7 |
| 63 | 504 | POS | M | 41 | Morada Nova-CE | 7 |
| 64 | 506 | POS | M | 39 | Itaiçaba-CE | 7 |
| 65 | 507 | NEG | M | 68 | Fortaleza-CE | 1 |
| 66 | 508 | POS | F | 47 | Tabuleiro do Norte-CE | 7 |
| 67* | 510 | POS | F | 50 | Mossoró-RN | 7 |

POS – Positivo, IND – Indeterminado e NEG - Negativo

A amostra 67 foi considerada pertencente a macrorregião do Litoral Leste / Jaguaribe.

APÊNDICE L – METODOLOGIA DO ESTUDO PILOTO E PCR-CONVENCIONAL

Em um estudo piloto, foi empregada a metodologia de extração de DNA total utilizando um kit comercial de extração BIOPUR KIT EXTRAÇÃO MINI SPIN PLUS - 50 (BP100-50), marca BIOPUR (gentilmente concedido pela empresa Biometrix Diagnóstica – Curitiba – PR - Brasil). Foram feitas 45 extrações de DNA total proveniente de solução de sangue + 6M Guanidina / HCl + 0,2M EDTA, segundo especificações do fabricante.

As amostras de sangue de 45 pacientes com diagnóstico de Chagas crônica foram agrupadas em três categorias: Sorologia Alta – amostras com resultados de IFI e ELISA acima da diluição 1:160 e absorbância 2,362, respectivamente.; Sorologia baixa – amostras com resultados de IFI e ELISA abaixo da diluição 1:160 e absorbância 1,695, respectivamente.; Negativos – amostras com 1 ou 2 resultados negativos de sorologia (IFI ou ELISA). Para o ensaio de PCR utilizou-se um volume de solução de DNA molde igual a 5,0 µL, juntamente com 3,0 µL de dNTP-MIX (10mM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas - Thermo Fisher Scientific Inc - USA), 2,0 µL de MgCl₂ (25mM) (Biometrix Diagnóstica – Curitiba – PR - Brasil), 5,0 µL de BUFFER (Biometrix Diagnóstica), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Biometrix Diagnóstica), 1,0 µL de iniciadores 121 / 122, ambos a 20 pmol. Foi adicionado água livre de DNase e RNase (INVITROGEN) finalizando para um volume total de 50 µL colocado em microtubo de 200 µL.

Os ciclos basearam-se em uma etapa a 94°C por 5 minutos (abertura inicial da fita de DNA), 35 repetições de: uma etapa a 95°C por 60 segundos (abertura da fita de DNA), uma etapa a 65°C por 60 segundos (anelamento dos iniciadores) e uma etapa a 72°C por 60 segundos (extensão da DNA polimerase) e, ao final das repetições, uma etapa a 72°C por 1 minuto (extensão final da DNA polimerase). Todas as reações foram efetuadas no termociclador Mastercycler 5332 (Eppendorf – Hamburgo, Alemanha) e, ao final do processo, conservadas a 4°C conforme programação do equipamento. Todo o procedimento foi efetuado em câmara de fluxo laminar NUAIRE MOD: NIH-03-112C (USA).

A eletroforese foi efetuada conforme Tópico 5.9.1. A fotodocumentação foi feita em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE HealthCare - General Electric Company - USA) no Laboratório de Micobactérias da UFC.

APÊNDICE M – RESULTADOS DO ESTUDO PILOTO

Das 45 amostras selecionadas para o estudo piloto, somente 37 puderam ser analisadas por PCR-convencional empregando um par de iniciadores, 121 / 122, para amplificar um fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto, uma vez que 8 amostras sofreram interferência do íon tiocianato. Este íon faz parte do composto Guanidina Tiocianato que foi erroneamente adicionado no tratamento destas oito amostras que apresentaram problema.

Dentre as amostras com altos índices de positividade sorológica (n =11) foi obtido 1 (9,09%) resultado positivo do xenodiagnóstico e 10 (90,91%) resultados negativos. Bem como, foi obtido 10 (90,91%) resultados positivos no PCR-convencional de amostra de sangue com extração de DNA por kit e 1 (9,09%) resultado negativo.

Dentre as amostras com baixos índices de positividade sorológica (n=14) foram obtidos somente resultados negativos no xenodiagnóstico. Bem como, foi obtido 11 (78,57%) de resultados positivos no PCR-convencional de amostra de sangue com extração de DNA por kit e 3 (21,43%) resultados negativos.

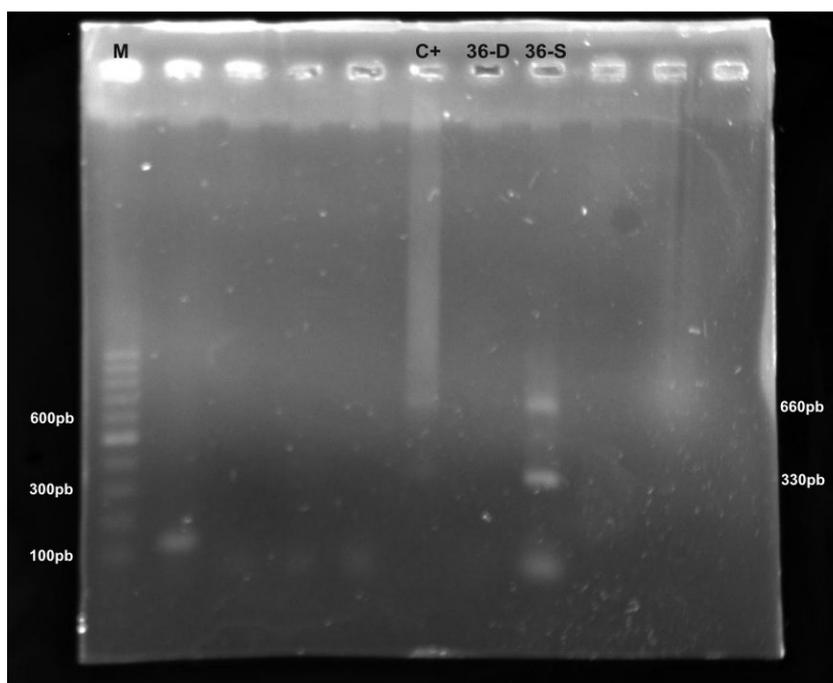
Dentre as amostras com negatividade sorológica (n=12) foram obtidos somente resultados negativos no xenodiagnóstico. Bem como, foram obtidos somente resultados positivos no PCR-convencional de amostra de sangue com extração de DNA por kit.

Pareamento dos resultados de amostras com altos índices de positividade sorológica, com baixos índices de positividade sorológica, com negatividade sorológica, xenodiagnóstico e PCR-Standart de amostras de sangue periférico com extração de DNA por kit comercial.

| Nº. de amostras | Sorologia | Xenodiano diagnóstico | | PCR-Standart | |
|-----------------|-----------------|-----------------------|-------------|--------------|------------|
| | | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| 37 | Alta (n=11) | 1 (9,09%) | 10 (90,91%) | 10 (90,91%) | 1 (9,09%) |
| | Baixa (n=14) | 0 | 14 (100%) | 11 (78,57%) | 3 (21,43%) |
| | Negativa (n=12) | 0 | 12(100%) | 12 (100%) | 0 |

APÊNDICE N – EXTRAÇÃO POR KIT PARA DEJETOS E SORO (AMOSTRA 36 DE DEJETOS E AMOSTRA 36 DE SORO)

Foto de gel de agarose a 1,5% revelado com Brometo de etídio (1mg/mL). Resultado de PCR com primers 121/(330pb) a 20pmol. Número corresponde a amostra 36 e a letra a origem do material (S-DNA molde de solução de sangue, D-DNA molde de solução de dejetos), M – marcador de 100pb e C+ corresponde a DNA molde de cultura de *T. cruzi*. Material genético extraído por kit comercial de extração de DNA.



APÊNDICE O – PAREAMENTO DOS RESULTADOS DE HAI, IFI, ELISA, PCR-CONVENCIONAL (ESTUDO PILOTO), PCR-MULTIPLEX PARA SANGUE E PCR-MULTIPLEX PARA DEJETOS DE TRIATOMÍNEOS (AMOSTRAS 1 A 34)

Classificação numérica (C.N) da amostras com referência ao número de ordem do paciente(N.O), resultados de hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI), ELISA, xenodiagnóstico (XD), PCR-I(S) - amostra de sangue humano com um par de iniciadores, 121 / 122 (ESTUDO PILOTO), PCR-II(S) - amostra de sangue humano com dois pares de iniciadores, 121/122 e DIAZ-7/DIAZ-8 e PCR-II(X) - dejetos de triatomíneos com dois pares de iniciadores, 121/122 e DIAZ-7/DIAZ-8.

| C.N | N.O | HAI | IFI | ELISA | Cut-off | XD | PCR-I(S) | PCR-II(S) | PCR-II(X) |
|-----|-----|-----------|-----------|------------|---------|-----|----------|-----------|-----------|
| 1 | 364 | NEG | NEG | NEG:0,040 | 0,357 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 2 | 365 | NEG | NEG | NEG:0,044 | 0,357 | NEG | POS | POS | NEG |
| 3 | 369 | POS>1:128 | POS 1:30 | POS:2,322 | 0,339 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 4 | 370 | NEG | POS 1:30 | POS:2,374 | 0,339 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 5 | 378 | POS>1:64 | POS 1:30 | POS:2,458 | 0,339 | NEG | POS | NEG | POS |
| 6 | 379 | NEG | POS 1:30 | POS:1,109 | 0,339 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 7 | 390 | NEG | POS 1:30 | POS:0,873 | 0,344 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 8 | 391 | POS>1:128 | POS 1:30 | POS:2,363 | 0,344 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 9 | 396 | POS>1:128 | POS 1:30 | POS:2,290 | 0,344 | NEG | POS | POS | NEG |
| 10 | 397 | POS>1:64 | POS 1:30 | POS:2,392 | 0,344 | NEG | POS | POS | POS |
| 11 | 398 | POS>1:64 | POS 1:30 | POS:2,147 | 0,344 | NEG | NEG | NEG | NEG |
| 12 | 399 | POS>1:64 | POS 1:30 | POS:1,664 | 0,344 | NEG | ----- | POS | NEG |
| 13 | 400 | NEG | POS 1:30 | POS:0,992 | 0,344 | NEG | POS | POS | POS |
| 14 | 401 | POS>1:64 | POS 1:30 | POS:2,296 | 0,344 | NEG | POS | NEG | POS |
| 15 | 402 | POS>1:64 | POS 1:30 | POS:1,464 | 0,731 | NEG | ----- | NEG | POS |
| 16 | 403 | POS>1:128 | POS 1:30 | POS:2,993 | 0,731 | NEG | POS | POS | NEG |
| 17 | 404 | POS>1:128 | POS 1:30 | POS:2,856 | 0,731 | NEG | NEG | NEG | POS |
| 18 | 405 | POS>1:128 | POS 1:30 | POS:2,185 | 0,731 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 19 | 406 | POS>1:128 | POS 1:30 | POS:2,634 | 0,731 | NEG | NEG | POS | POS |
| 20 | 407 | NEG | NEG | NEG:0,150 | 0,731 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 21 | 420 | POS>1:128 | POS 1:160 | POS: 1,695 | 1,295 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 22 | 423 | POS>1:128 | POS 1:320 | POS:1,829 | 1,295 | NEG | ----- | NEG | NEG |
| 23 | 424 | POS>1:128 | POS 1:80 | POS:1,632 | 1,295 | NEG | ----- | NEG | NEG |
| 24 | 425 | POS>1:128 | POS 1:160 | POS:1,815 | 1,295 | NEG | ----- | POS | NEG |
| 25 | 426 | POS>1:64 | POS 1:320 | POS:2,622 | 1,295 | NEG | POS | NEG | POS |
| 26 | 427 | POS>1:128 | POS 1:320 | POS:2,886 | 1,295 | NEG | POS | POS | NEG |
| 27 | 436 | POS>1:128 | POS 1:320 | POS:2,148 | 1,295 | NEG | ----- | NEG | POS |
| 28 | 437 | POS>1:128 | POS 1:320 | POS:2,753 | 1,295 | NEG | NEG | NEG | POS |
| 29 | 438 | POS≥1:32 | POS 1:160 | POS:2,066 | 1,295 | NEG | ----- | POS | POS |
| 30 | 446 | NEG | NEG | POS:0,897 | 0,731 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 31 | 447 | POS>1:64 | POS 1:320 | POS:2,362 | 0,731 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 32 | 448 | POS>1:128 | POS 1:320 | POS:2,927 | 0,731 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 33 | 449 | NEG | POS 1:160 | POS:2,745 | 0,731 | NEG | POS | POS | NEG |
| 34 | 450 | POS>1:64 | POS 1:640 | POS:2,571 | 0,731 | NEG | POS | NEG | NEG |

Amostras com a indicação (-----) não foram incluídas no estudo piloto.

APÊNDICE P – PAREAMENTO DOS RESULTADOS DE HAI, IFI, ELISA, PCR-CONVENCIONAL (ESTUDO PILOTO), PCR-MULTIPLEX PARA SANGUE E PCR-MULTIPLEX PARA DEJETOS DE TRIATOMÍNEOS (AMOSTRAS 35 a 67)

Classificação numérica (C.N) da amostras com referência ao número de ordem do paciente(N.O), resultados de hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI), ELISA, xenodiagnóstico (XD), PCR-I(S) - amostra de sangue humano com um par de iniciadores, 121 / 122 (ESTUDO PILOTO), PCR-II(S) - amostra de sangue humano com dois pares de iniciadores, 121/122 e DIAZ-7/DIAZ-8 e PCR-II(X) - dejetos de triatomíneos com dois pares de iniciadores, 121/122 e DIAZ-7/DIAZ-8.

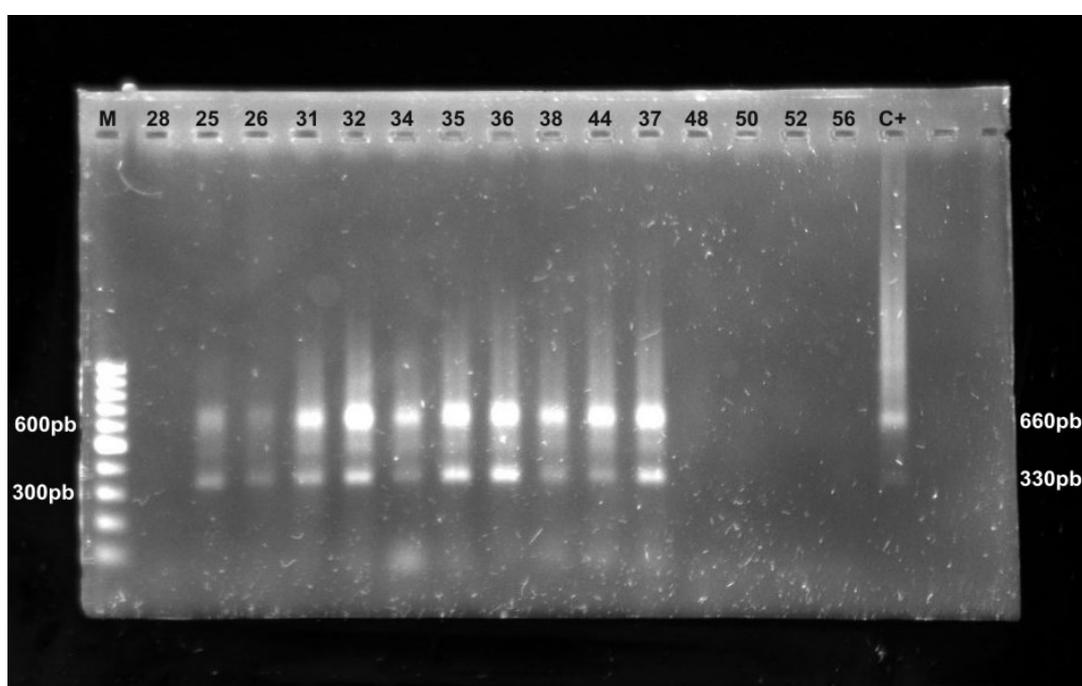
| C.N | N.O | HAI | IFI | ELISA | Cut-off | XD | PCR-I(S) | PCR-II(S) | PCR-II(X) |
|-----|-----|-----------|-----------|-----------|---------|-----|----------|-----------|-----------|
| 35 | 457 | POS>1:128 | POS 1:320 | POS:2,753 | 0,731 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 36 | 467 | POS>1:128 | POS 1:320 | POS:2,786 | 1,017 | NEG | POS | POS | POS |
| 37 | 468 | POS>1:128 | POS 1:160 | POS:2,963 | 1,017 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 38 | 469 | POS>1:128 | POS 1:640 | POS:3,103 | 1,017 | NEG | POS | POS | NEG |
| 39 | 471 | POS>1:128 | POS 1:40 | POS:2,381 | 1,017 | NEG | POS | POS | NEG |
| 40 | 472 | POS>1:128 | POS 1:40 | POS:1,772 | 1,017 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 41 | 473 | NEG | POS 1:80 | NEG:0,443 | 1,017 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 42 | 474 | POS>1:128 | POS 1:160 | POS:2,523 | 1,017 | NEG | ----- | POS | NEG |
| 43 | 475 | NEG | NEG | NEG:0,119 | 1,017 | NEG | POS | NEG | NEG |
| 44 | 477 | POS>1:64 | POS 1:640 | POS:2,807 | 1,017 | POS | POS | NEG | POS |
| 45 | 479 | NEG | POS 1:80 | POS:1,642 | 1,017 | NEG | POS | POS | NEG |
| 46 | 480 | POS>1:128 | POS 1:160 | POS:2,635 | 1,017 | NEG | ----- | NEG | POS |
| 47 | 481 | POS>1:128 | POS 1:640 | POS:1,421 | 1,017 | NEG | ----- | POS | NEG |
| 48 | 487 | POS>1:128 | POS 1:640 | POS:2,627 | 1,017 | NEG | ERRO | NEG | POS |
| 49 | 488 | POS>1:128 | POS 1:160 | POS:2,176 | 1,017 | NEG | ----- | NEG | POS |
| 50 | 489 | POS>1:64 | POS 1:160 | POS:2,754 | 1,017 | NEG | ERRO | NEG | POS |
| 51 | 491 | NEG | POS 1:80 | POS:2,276 | 1,017 | NEG | ERRO | NEG | NEG |
| 52 | 492 | POS≥1:32 | POS 1:160 | POS:2,650 | 1,017 | NEG | ERRO | NEG | POS |
| 53 | 493 | NEG | POS 1:160 | POS:2,553 | 1,017 | NEG | ----- | NEG | NEG |
| 54 | 494 | NEG | POS 1:160 | POS:1,800 | 0,731 | NEG | ----- | NEG | NEG |
| 55 | 495 | NEG | POS 1:40 | POS:1,259 | 0,731 | NEG | ----- | NEG | NEG |
| 56 | 497 | POS>1:128 | POS 1:160 | POS:2,644 | 0,731 | NEG | ERRO | NEG | NEG |
| 57 | 498 | NEG | NEG | NEG:0,319 | 0,731 | NEG | ERRO | NEG | NEG |
| 58 | 499 | POS>1:128 | POS 1:160 | POS:1,018 | 0,731 | NEG | ----- | NEG | NEG |
| 59 | 500 | POS>1:128 | POS 1:320 | POS:2,008 | 0,731 | NEG | ----- | NEG | NEG |
| 60 | 501 | POS>1:128 | POS 1:80 | POS:2,417 | 0,731 | NEG | ERRO | NEG | NEG |
| 61 | 502 | NEG | POS 1:160 | POS:2,368 | 0,731 | NEG | ----- | POS | POS |
| 62 | 503 | POS>1:128 | POS 1:160 | POS:2,291 | 0,731 | NEG | ----- | POS | POS |
| 63 | 504 | POS>1:128 | POS 1:160 | POS:1,822 | 0,731 | NEG | ----- | NEG | NEG |
| 64 | 506 | NEG | POS 1:160 | POS:2,707 | 0,731 | NEG | ----- | NEG | NEG |
| 65 | 507 | NEG | NEG | NEG:0,125 | 0,731 | NEG | ERRO | POS | NEG |
| 66 | 508 | POS≥1:32 | POS 1:160 | POS:2,828 | 0,731 | NEG | ----- | NEG | NEG |
| 67 | 510 | NEG | POS 1:40 | POS:1,689 | 0,817 | NEG | ----- | NEG | NEG |

Amostras com a indicação (-----) não foram incluídas no estudo piloto e com a indicação (ERRO) sofreram interferência do íon tiocianato, do composto Guanidina Tiocianato.

APÊNDICE Q – ELETROFORESE DE AMOSTRAS COM ALTA POSITIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)

Resultado de ensaio de PCR-convencional (empregando os iniciadores 121/122 para amplificar um produto de 330pb do DNA do cinetoplasto) para as amostras de sangue com alta positividade sorológica (ESTUDO PILOTO), extraídas por kit. As amostras 48, 50, 52 e 56 apresentaram interferência do íon tiocianato (Guanidina Tiocianato). A análise espectrofotométrica completa consta no APÊNDICE T.

Foto de gel de agarose a 1,5% revelado com Brometo de etídio (1mg/mL). As amostras 25, 26, 31, 32, 34, 35, 36, 38, 44 e 37 apresentaram positividade na amplificação do fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto, bem como, do fragmento de 660 pb, que é múltiplo do fragmento de 330 pb. (C+) – DNA de cultura de *T. cruzi*.



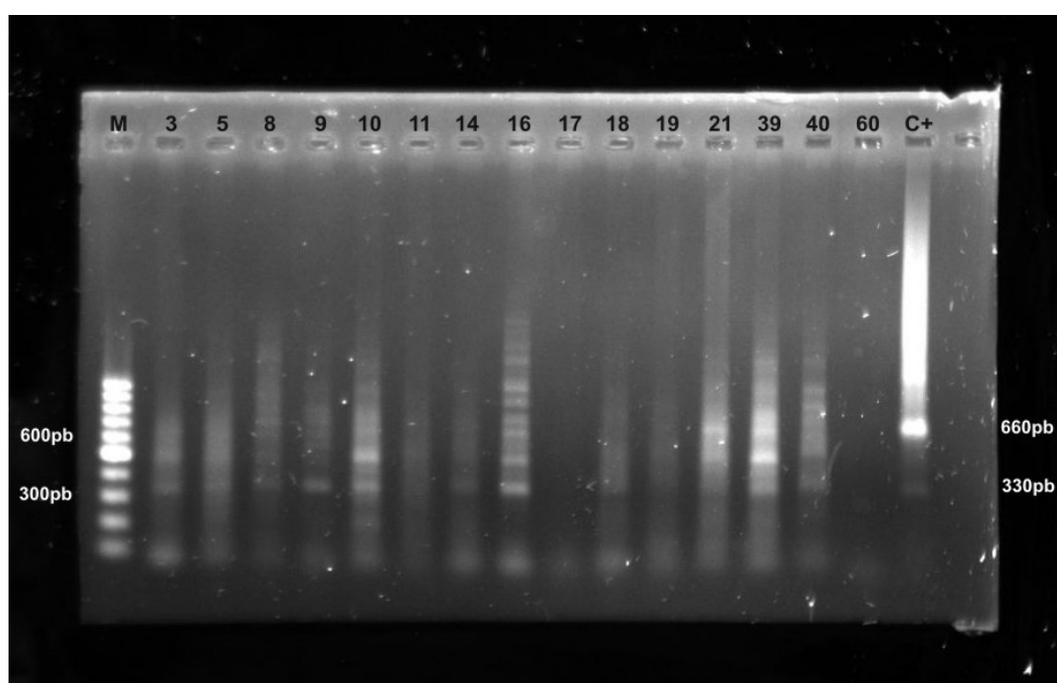
Análise espectrofotométrica de amostras de DNA extraídas de sangue humano por meio de kit de extração de DNA para um volume de 200 μ L de tampão específico do kit de extração (APÊNDICE T).

| Classificação numérica | Sample ID | ng/ μ l | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 |
|------------------------|-----------|-------------|--------|--------|---------|----------|
| 25 | 426 | 12,69 | 0,254 | 0,128 | 1,98 | 0,88 |
| 26 | 427 | 23,73 | 0,475 | 0,239 | 1,98 | 0,66 |
| 28 | 437 | 2,98 | 0,06 | 0,025 | 2,4 | 0,12 |
| 31 | 447 | 3,89 | 0,078 | 0,033 | 2,36 | 0,35 |
| 32 | 448 | 0,97 | 0,019 | 0,011 | 1,81 | 0,3 |
| 34 | 450 | 2,52 | 0,05 | 0,025 | 2 | 0,19 |
| 35 | 457 | 2,57 | 0,051 | 0,002 | 22,67 | 0,14 |
| 36 | 467 | 1,54 | 0,031 | 0,01 | 3,24 | 0,06 |
| 37 | 468 | 2 | 0,04 | 0,016 | 2,46 | 0,28 |
| 38 | 469 | 3,85 | 0,077 | 0,039 | 2 | 0,12 |
| 44 | 477 | 4,6 | 0,092 | 0,026 | 3,5 | 0,52 |
| 48 | 487 | -260,13 | -5,203 | -5,98 | 0,87 | 1,74 |
| 50 | 489 | -152,08 | -3,042 | -3,489 | 0,87 | -1468,46 |
| 52 | 492 | -117,72 | -2,354 | -2,733 | 0,86 | -6,43 |
| 56 | 497 | -98,53 | -1,971 | -2,317 | 0,85 | -1,14 |

APÊNDICE R – ELETROFORESE DE AMOSTRAS COM BAIXA POSITIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)

Resultado de ensaio de PCR-convencional (empregando os iniciadores 121/122 para amplificar um produto de 330pb dp DNA do cinetoplasto) para as amostras de sangue com baixa positividade sorológica (ESTUDO PILOTO), extraídas por kit. A amostra 60 apresentou interferência do íon tiocianato (Guanidina Tiocianato). A análise espectrofotométrica completa consta no APÊNDICE U.

Foto de gel de agarose a 1,5% revelado com Brometo de etídio (1mg/mL). As amostras 3, 5, 8, 9, 10, 14, 16, 18, 21, 39 e 40 apresentaram positividade na amplificação do fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto. (C+) – DNA de cultura de *T. cruzi*.



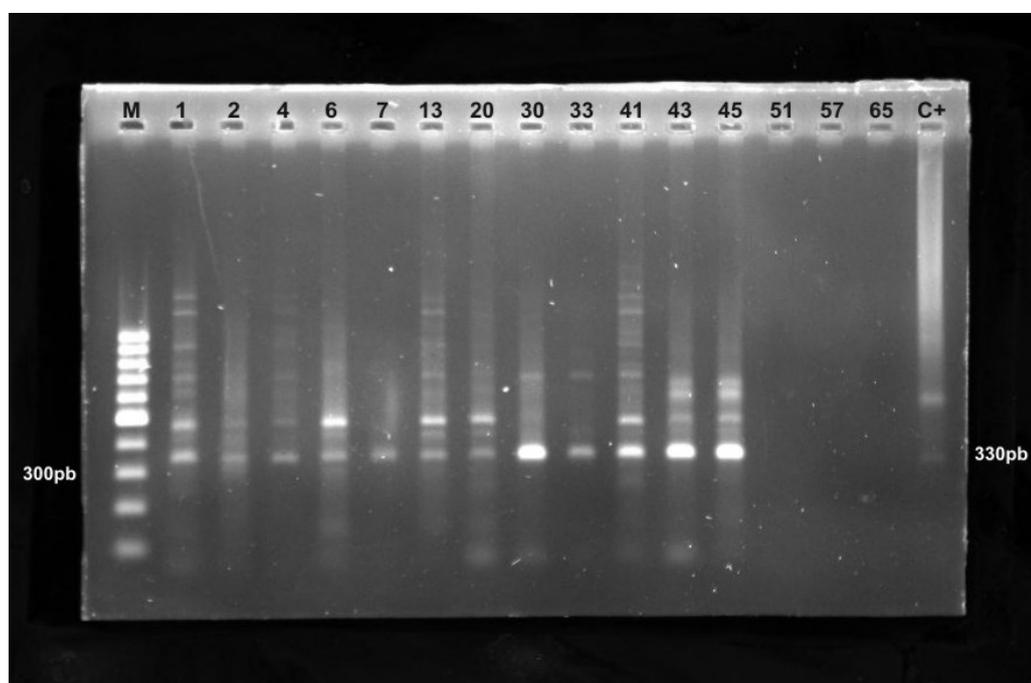
Análise espectrofotométrica de amostras de DNA extraídas de sangue humano por meio de kit de extração de DNA para um volume de 200 μ L de tampão específico do kit de extração (APÊNDICE U).

| Classificação numérica | Sample ID | ng/ μ l | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 |
|------------------------|-----------|-------------|--------|--------|---------|---------|
| 3 | 369 | 28,35 | 0,567 | 0,309 | 1,83 | 0,28 |
| 5 | 378 | 8,49 | 0,17 | 0,09 | 1,88 | 0,04 |
| 8 | 391 | 2,39 | 0,048 | 0,02 | 2,4 | 0,17 |
| 9 | 396 | 2,39 | 0,048 | 0,019 | 2,45 | 0,1 |
| 10 | 397 | 16,75 | 0,335 | 0,183 | 1,83 | 0,73 |
| 11 | 398 | 11,95 | 0,239 | 0,123 | 1,94 | 1,16 |
| 14 | 401 | 5,68 | 0,114 | 0,038 | 2,98 | 0,34 |
| 16 | 403 | 3,09 | 0,062 | 0,031 | 1,99 | 0,18 |
| 17 | 404 | 7,4 | 0,148 | 0,083 | 1,79 | 0,08 |
| 18 | 405 | 1,62 | 0,032 | -0,035 | -0,93 | 0,18 |
| 19 | 406 | 8,23 | 0,165 | 0,085 | 1,94 | 0,85 |
| 21 | 420 | 45 | 0,9 | 0,477 | 1,89 | 1,66 |
| 39 | 471 | 11,49 | 0,23 | 0,124 | 1,86 | 0,12 |
| 40 | 472 | 6,19 | 0,124 | 0,067 | 1,83 | 0,23 |
| 60 | 501 | -201,41 | -4,028 | -4,641 | 0,87 | 2,2 |

APÊNDICE S – ELETROFORESE DE AMOSTRAS COM NEGATIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)

Resultado de ensaio de PCR-convencional (empregando os iniciadores 121/122 para amplificar um produto de 330pb do DNA do cinetoplasto) para as amostras de sangue com Sorologia Negativa (ESTUDO PILOTO) extraídas por kit. As amostras 51, 57 e 65 apresentaram problema em função do íon tiocianato (Guanidina Tiocianato). A análise espectrofotométrica completa consta no APÊNDICE V.

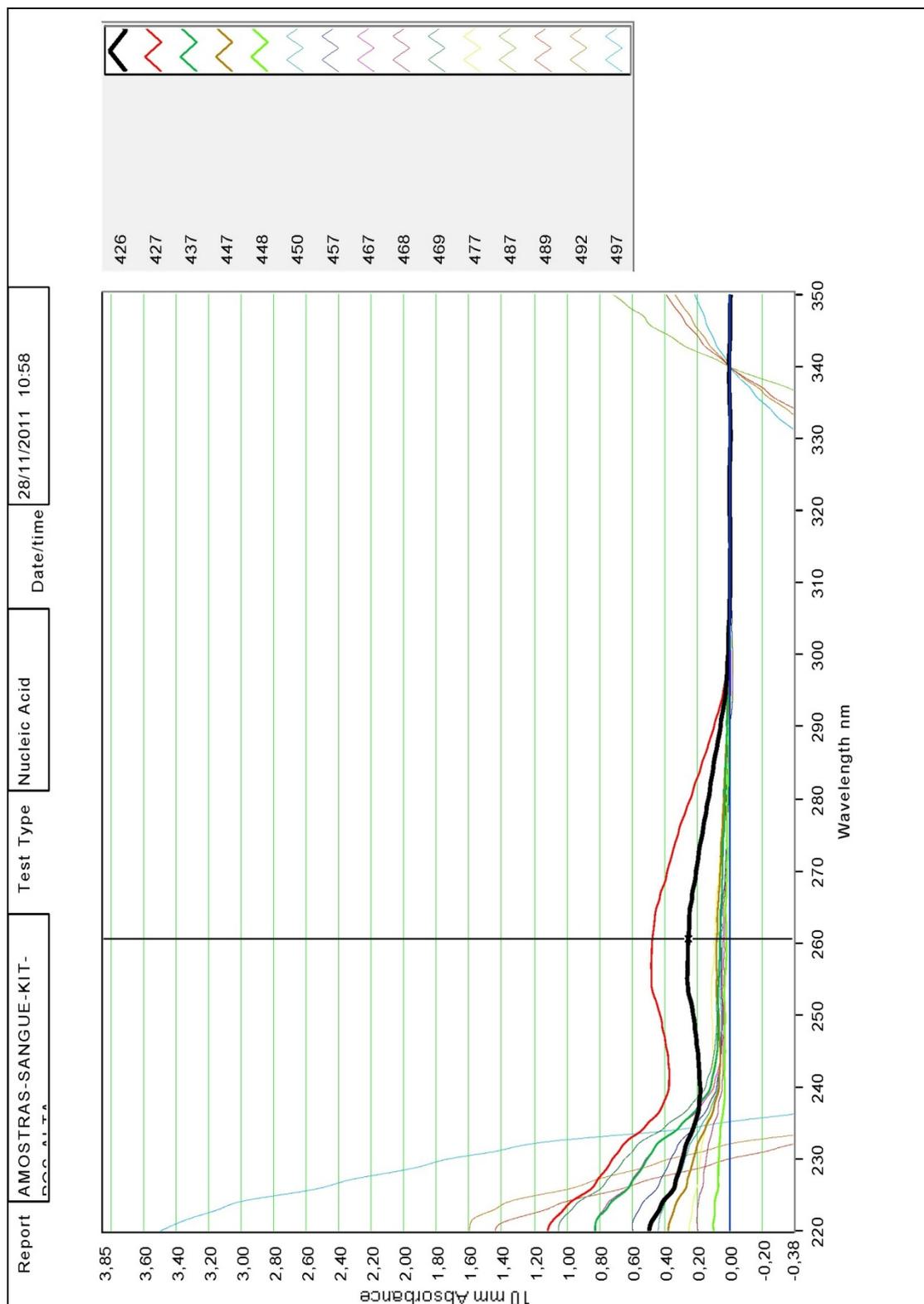
Foto de gel de agarose a 1,5% revelado com Brometo de etídio (1mg/mL). As amostras 1, 2, 4, 6, 7, 13, 20, 30, 33, 41, 43 e 45 apresentaram positividade na amplificação do fragmento de 330 pb do DNA do cinetoplasto, bem como, algumas amostras exibiram o fragmento de 660 pb, que é múltiplo do fragmento de 330 pb. (C+) – DNA de cultura de *T. cruzi*.



Análise espectrofotométrica de amostras de DNA extraídas de sangue humano por meio de kit de extração de DNA para um volume de 200 μ L de tampão específico do kit de extração (APÊNDICE V).

| Classificação numérica | Sample ID | ng/ μ l | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 |
|------------------------|-----------|-------------|--------|---------|---------|---------|
| 1 | 364 | 9,7 | 0,194 | 0,098 | 1,97 | 0,41 |
| 2 | 365 | 3,68 | 0,074 | 0,054 | 1,36 | 0,08 |
| 4 | 370 | 2,87 | 0,057 | 0,041 | 1,39 | 0,14 |
| 6 | 379 | 35,57 | 0,711 | 0,369 | 1,93 | 1,06 |
| 7 | 390 | 5,41 | 0,108 | 0,077 | 1,41 | 0,11 |
| 13 | 400 | 38,78 | 0,776 | 0,411 | 1,89 | 0,47 |
| 20 | 407 | 48,38 | 0,968 | 0,515 | 1,88 | 1,67 |
| 30 | 446 | 0,42 | 0,008 | -0,007 | -1,18 | 0,07 |
| 33 | 449 | 0,64 | 0,013 | 0,014 | 0,92 | 0,04 |
| 41 | 473 | 10,87 | 0,217 | 0,128 | 1,69 | 0,11 |
| 43 | 475 | 30,16 | 0,603 | 0,309 | 1,95 | 1,08 |
| 45 | 479 | 22,59 | 0,452 | 0,252 | 1,79 | 0,4 |
| 51 | 491 | -278,94 | -5,579 | -6,423 | 0,87 | 1,52 |
| 57 | 498 | -363,7 | -7,274 | -8,288 | 0,88 | 1,45 |
| 65 | 507 | -451,38 | -9,028 | -10,363 | 0,87 | 1,41 |

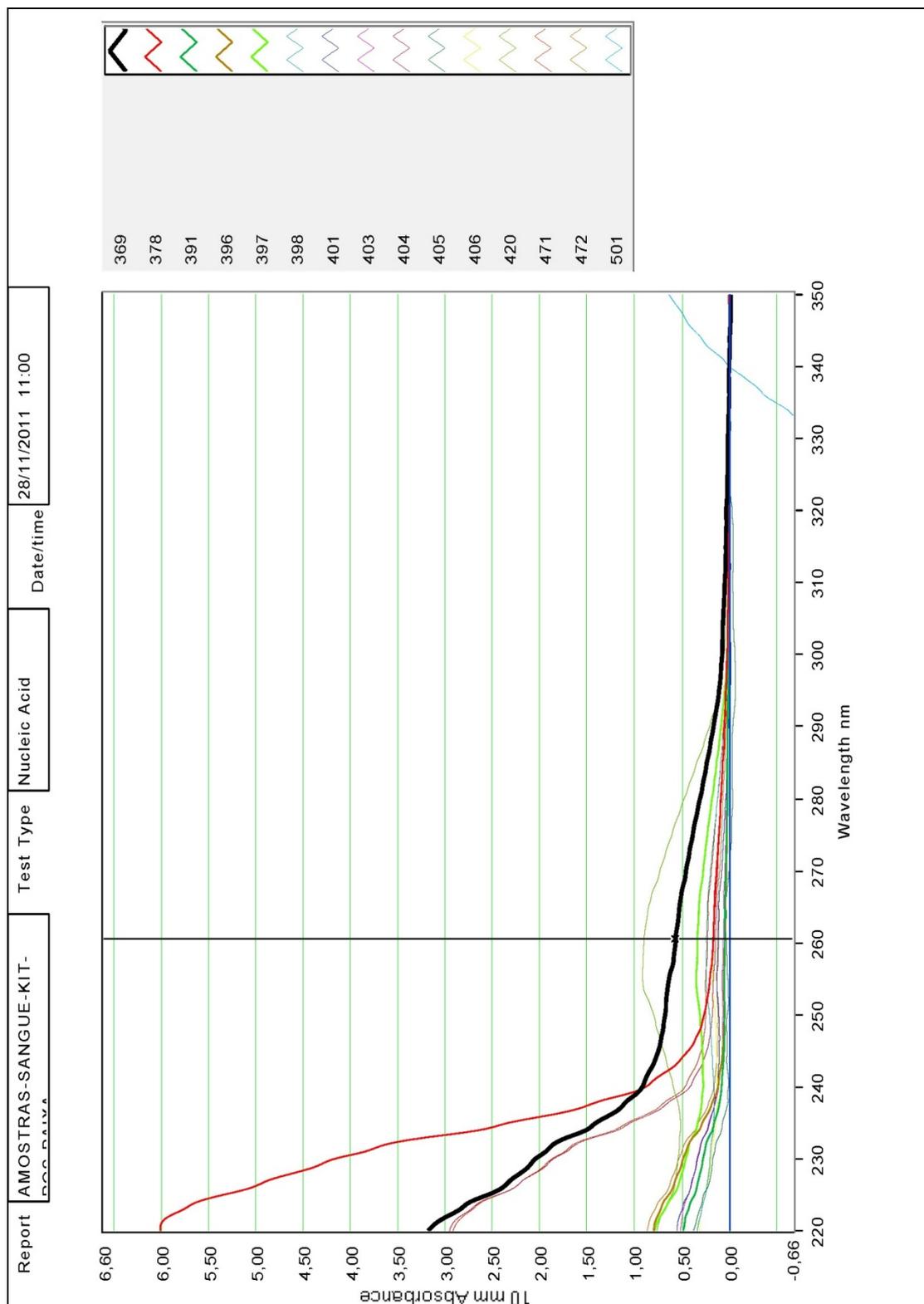
APÊNDICE T – ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS COM ALTA POSITIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)



APÊNDICE T – ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS COM ALTA POSITIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO) (CONTINUAÇÃO)

| Report | AMOSTRAS-SANGUE-KIT- S.A.L.L.A. | Test Type | Nucleic Acid | Date/Time | | Page # | | | | | | | | | |
|-----------|------------------------------------|------------|--------------|-----------|--------|--------|---------|----------|----------|-------------|-------------|---------|------------------|----------------|----------------------|
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A.260 | A.280 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
| 426 | Default | 18/10/2011 | 11:43 | 12,69 | 0,254 | 0,128 | 1,98 | 0,88 | 50,00 | 230 | 0,288 | 0,022 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 427 | Default | 18/10/2011 | 11:44 | 23,73 | 0,475 | 0,239 | 1,98 | 0,66 | 50,00 | 230 | 0,718 | 0,014 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 437 | Default | 18/10/2011 | 11:45 | 2,98 | 0,060 | 0,025 | 2,40 | 0,12 | 50,00 | 230 | 0,505 | 0,046 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 447 | Default | 18/10/2011 | 11:46 | 3,89 | 0,078 | 0,033 | 2,36 | 0,35 | 50,00 | 230 | 0,220 | 0,018 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 448 | Default | 18/10/2011 | 11:48 | 0,97 | 0,019 | 0,011 | 1,81 | 0,30 | 50,00 | 230 | 0,064 | 0,075 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 450 | Default | 18/10/2011 | 11:49 | 2,52 | 0,050 | 0,025 | 2,00 | 0,19 | 50,00 | 230 | 0,272 | 0,021 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 457 | Default | 18/10/2011 | 11:50 | 2,57 | 0,051 | 0,002 | 22,67 | 0,14 | 50,00 | 230 | 0,360 | 0,029 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 457 | Default | 18/10/2011 | 11:51 | 1,54 | 0,051 | 0,010 | 3,24 | 0,06 | 50,00 | 230 | 0,513 | 0,009 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 468 | Default | 18/10/2011 | 11:52 | 2,00 | 0,040 | 0,016 | 2,46 | 0,28 | 50,00 | 230 | 0,141 | 0,078 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 469 | Default | 18/10/2011 | 11:53 | 3,85 | 0,077 | 0,039 | 2,00 | 0,12 | 50,00 | 230 | 0,643 | -0,010 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 477 | Default | 18/10/2011 | 11:54 | 4,00 | 0,092 | 0,026 | 3,50 | 0,62 | 50,00 | 230 | 0,178 | 0,154 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 487 | Default | 18/10/2011 | 11:55 | -260,13 | -5,203 | -5,980 | 0,87 | 1,74 | 50,00 | 230 | -2,983 | 11,225 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 489 | Default | 18/10/2011 | 11:56 | -152,08 | -3,042 | -3,489 | 0,87 | -1458,46 | 50,00 | 230 | 0,002 | 6,432 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 492 | Default | 18/10/2011 | 11:58 | -117,72 | -2,354 | -2,733 | 0,86 | -6,43 | 50,00 | 230 | 0,366 | 4,888 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |
| 497 | Default | 18/10/2011 | 11:59 | -98,63 | -1,971 | -2,317 | 0,85 | -1,14 | 50,00 | 230 | 1,726 | 4,359 | Measure | USB2C39487B047 | 1,000088/0,57/112/16 |

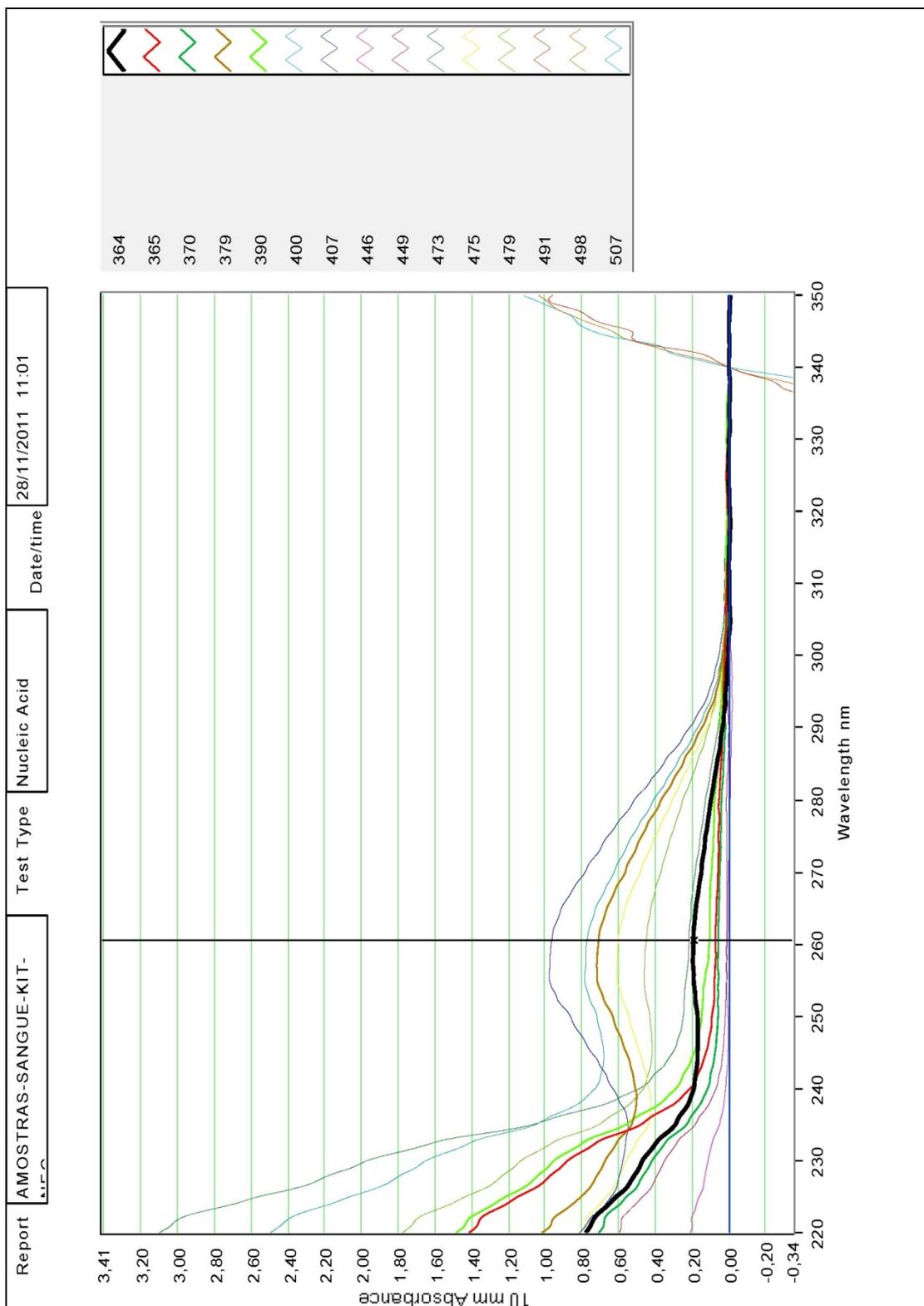
APÊNDICE U – ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS COM BAIXA POSITIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)



APÊNDICE U – ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS COM BAIXA POSITIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO) (CONTINUAÇÃO)

| Report | | AMOSTRAS-SANGUE-KIT- S.C.B.U.V. | | Test Type | | Nucleic Acid | | Date/Time | | 28/11/2011 11:00 | | Page # | | 1 | |
|-----------|---------|------------------------------------|-------|-----------|--------|--------------|---------|-----------|----------|------------------|-------------|---------|------------------|-----------------|---------------------|
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A 280 | A 320 | 280/280 | 280/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
| 389 | Default | 18/10/2011 | 12:16 | 26,35 | 0,557 | 0,309 | 1,93 | 0,26 | 50,00 | 230 | 2,047 | 0,065 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 378 | Default | 18/10/2011 | 12:17 | 8,49 | 0,170 | 0,090 | 1,88 | 0,04 | 50,00 | 230 | 4,168 | -0,029 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 391 | Default | 18/10/2011 | 12:18 | 2,39 | 0,048 | 0,020 | 2,40 | 0,17 | 50,00 | 230 | 0,278 | 0,006 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 396 | Default | 18/10/2011 | 12:19 | 2,39 | 0,048 | 0,019 | 2,45 | 0,10 | 50,00 | 230 | 0,489 | 0,043 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 397 | Default | 18/10/2011 | 12:20 | 16,75 | 0,336 | 0,183 | 1,83 | 0,73 | 50,00 | 230 | 0,460 | 0,039 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 398 | Default | 18/10/2011 | 12:21 | 11,95 | 0,239 | 0,123 | 1,94 | 1,16 | 50,00 | 230 | 0,205 | 0,005 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 401 | Default | 18/10/2011 | 12:21 | 5,68 | 0,114 | 0,038 | 2,88 | 0,34 | 50,00 | 230 | 0,335 | 0,079 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 403 | Default | 18/10/2011 | 12:22 | 3,09 | 0,062 | 0,031 | 1,99 | 0,18 | 50,00 | 230 | 0,341 | 0,103 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 404 | Default | 18/10/2011 | 12:23 | 7,40 | 0,148 | 0,083 | 1,79 | 0,08 | 50,00 | 230 | 1,866 | 0,002 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 405 | Default | 18/10/2011 | 12:24 | 1,62 | 0,032 | -0,035 | -0,93 | 0,18 | 50,00 | 230 | 0,176 | 0,398 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 406 | Default | 18/10/2011 | 12:26 | 8,23 | 0,165 | 0,085 | 1,94 | 0,85 | 50,00 | 230 | 0,194 | 0,029 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 420 | Default | 18/10/2011 | 12:26 | 45,00 | 0,900 | 0,477 | 1,99 | 1,66 | 50,00 | 230 | 0,541 | 0,061 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 471 | Default | 18/10/2011 | 12:27 | 11,49 | 0,230 | 0,124 | 1,86 | 0,12 | 50,00 | 230 | 1,873 | 0,004 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 472 | Default | 18/10/2011 | 12:28 | 6,19 | 0,124 | 0,067 | 1,83 | 0,23 | 50,00 | 230 | 0,533 | 0,120 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |
| 501 | Default | 18/10/2011 | 12:29 | -201,41 | -4,028 | -4,641 | 0,87 | 2,20 | 50,00 | 230 | -1,828 | 8,465 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000098/0,57128/24 |

APÊNDICE V – ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS COM NEGATIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO)



APÊNDICE V – ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS COM NEGATIVIDADE SOROLÓGICA (ESTUDO PILOTO) (CONTINUAÇÃO)

| Report | | AMOSTRAS-SANGUE-KIT- L.P.S. | | Test Type | | Nucleic Acid | | DateTime | | 28/11/2011 11:01 | | Page # 1 | | | |
|-----------|---------|--------------------------------|-------|-----------|--------|--------------|---------|----------|----------|------------------|-------------|----------|------------------|-----------------|-----------------------|
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A.280 | A.280 | 280/280 | 280/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw | Measurement Type | Serial # | Config. |
| 364 | Default | 18/10/2011 | 12:33 | 9,70 | 0,194 | 0,088 | 1,87 | 0,41 | 50,00 | 230 | 0,471 | 0,001 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 365 | Default | 18/10/2011 | 12:33 | 3,66 | 0,074 | 0,064 | 1,36 | 0,08 | 50,00 | 230 | 0,878 | 0,010 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 370 | Default | 18/10/2011 | 12:34 | 2,87 | 0,057 | 0,041 | 1,39 | 0,14 | 50,00 | 230 | 0,419 | 0,003 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 379 | Default | 18/10/2011 | 12:35 | 35,57 | 0,711 | 0,369 | 1,93 | 1,06 | 50,00 | 230 | 0,674 | 0,017 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 380 | Default | 18/10/2011 | 12:36 | 5,41 | 0,108 | 0,077 | 1,41 | 0,11 | 50,00 | 230 | 0,952 | 0,230 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 400 | Default | 18/10/2011 | 12:37 | 38,78 | 0,776 | 0,411 | 1,89 | 0,47 | 50,00 | 230 | 1,649 | 0,008 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 407 | Default | 18/10/2011 | 12:37 | 48,38 | 0,968 | 0,515 | 1,88 | 1,87 | 50,00 | 230 | 0,578 | 0,022 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 446 | Default | 18/10/2011 | 12:39 | 0,42 | 0,008 | -0,007 | -1,18 | 0,07 | 50,00 | 230 | 0,114 | 0,012 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 449 | Default | 18/10/2011 | 12:39 | 0,64 | 0,013 | 0,014 | 0,92 | 0,04 | 50,00 | 230 | 0,360 | -0,011 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 473 | Default | 18/10/2011 | 12:40 | 10,87 | 0,217 | 0,128 | 1,99 | 0,11 | 50,00 | 230 | 1,969 | 0,007 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 475 | Default | 18/10/2011 | 12:41 | 30,16 | 0,603 | 0,309 | 1,85 | 1,08 | 50,00 | 230 | 0,560 | 0,010 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 479 | Default | 18/10/2011 | 12:41 | 22,59 | 0,452 | 0,262 | 1,79 | 0,40 | 50,00 | 230 | 1,132 | -0,006 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 491 | Default | 18/10/2011 | 12:42 | -278,84 | -5,579 | -6,423 | 0,87 | 1,52 | 50,00 | 230 | -3,674 | 20,377 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 498 | Default | 18/10/2011 | 12:43 | -363,70 | -7,274 | -8,288 | 0,88 | 1,46 | 50,00 | 230 | -5,024 | 15,935 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |
| 507 | Default | 18/10/2011 | 12:45 | -451,38 | -9,028 | -10,363 | 0,87 | 1,41 | 50,00 | 230 | -6,416 | 20,206 | Measure | USB2G39487B1647 | 1,000088/0,67/11/2/24 |

APÊNDICE X – ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 121 – 1

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (27 letters) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/BLAST/blastn suite/](#) [Formatting Results - HB1JRE31015](#)
[Formatting options](#)
[Download](#)

Nucleotide Sequence (27 letters)

| | | | |
|---------------|--------------|---------------|---|
| Query ID | klj23113 | Database Name | nr |
| Description | None | Description | All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) |
| Molecule type | nucleic acid | Program | BLASTN 2.2.26+ |
| Query Length | 27 | | |

Graphic Summary

Distribution of 117 Blast Hits on the Query Sequence

Color key for alignment scores

| | | | | |
|-----|-------|-------|--------|-------|
| <40 | 40-50 | 50-80 | 80-200 | >=200 |
|-----|-------|-------|--------|-------|

Query | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25

1 de 19 17-01-2012 11:38

APÊNDICE X – ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 121 – 1
(CONTINUAÇÃO)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (27 letters) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Descriptions
Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [G](#) GEO [B](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|---|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|-------|
| FR719701.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 3691, clone G2 | 38.2 | 76.3 | 100% | 1.0 | 96% | |
| FR719698.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9813, clone 53C | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| FN598996.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9840-15, clone 62C | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| FJ007376.1 | Trypanosoma cruzi clone 129-c102 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| FN397828.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, patient 55, clone c168 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| FN397824.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, patient 50, clone c120 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| FM207287.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle and ORF314 DNA, case 1409_7, clone 314 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| FM207251.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, patient 1434_85, clone 212E | 38.2 | 66.4 | 100% | 1.0 | 96% | |
| EU088396.1 | Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone B10 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| EU088393.1 | Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone D1 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| EU088379.1 | Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone A9 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| EU088378.1 | Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone A4 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| EU088377.1 | Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone A2 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| DQ835660.1 | Trypanosoma cruzi clone 533-FF05 kinetoplast minicircle, partial sequence | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| DQ835659.1 | Trypanosoma cruzi clone 531-FF01 kinetoplast minicircle, partial sequence | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| DQ835656.1 | Trypanosoma cruzi clone 531-F03 kinetoplast minicircle, partial sequence | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| DQ835652.1 | Trypanosoma cruzi clone 531-D03 kinetoplast minicircle, partial sequence | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| DQ835650.1 | Trypanosoma cruzi clone 531-B03 kinetoplast minicircle, partial sequence | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AF242560.1 | Trypanosoma cruzi clone FGz 8-1 kinetoplast minicircle sequence | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AF242563.1 | Trypanosoma cruzi clone FGz 8-4 kinetoplast minicircle sequence | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ748081.1 | Trypanosoma cruzi marinkellei kinetoplast minicircle, strain M109, isolate Tm_15 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ748079.1 | Trypanosoma cruzi marinkellei kinetoplast minicircle, strain M109, isolate Tm_13 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ748076.1 | Trypanosoma cruzi marinkellei kinetoplast minicircle, strain M109, isolate Tm_9 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ748063.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIe, strain X154/7, isolate JP703 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ748030.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIc, strain Sc43 d1, isolate JP704 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ748002.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIc, strain MN d2, isolate 02mp03 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ748001.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIc, strain MN d2, isolate 02mp02 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ748000.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIc, strain MN d2, isolate 02mp01 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ747996.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIb, strain Tu18 d2, isolate 02mp37 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ747995.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIb, strain Tu18 d2, isolate 02mp36 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ747994.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIb, strain Tu18 d2, isolate 02mp30 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ747993.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIb, strain Tu18 d2, isolate 02mp29 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ747992.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIb, strain Tu18 d2, isolate 02mp28 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |
| AJ747991.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage IIb, strain Tu18 d2, isolate 02mp26 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.0 | 96% | |

2 de 19 17-01-2012 11:38

APÊNDICE X – ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 121 – 1
(CONTINUAÇÃO)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (27 letters) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

NOP
ERROR.ERROR.ERROR.ERROR

Alignments

>emb|FR719701.1| Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 3691, clone G2
Length=917

Sort alignments for this subject sequence by:
E value Score Percent identity
Query start position Subject start position

Score = 38.2 bits (19), Expect = 1.0
Identities = 26/27 (96%), Gaps = 1/27 (4%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAATAATGTTACGGGTGAGATGCATGA 27
Sbjct 273 AAATAATGT-ACGGGTGAGATGCATGA 298

Score = 38.2 bits (19), Expect = 1.0
Identities = 26/27 (96%), Gaps = 1/27 (4%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAATAATGTTACGGGTGAGATGCATGA 27
Sbjct 611 AAATAATGT-ACGGGTGAGATGCATGA 636

>emb|FR719698.1| Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9813, clone 53C
Length=519

Score = 38.2 bits (19), Expect = 1.0
Identities = 26/27 (96%), Gaps = 1/27 (4%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAATAATGTTACGGGTGAGATGCATGA 27
Sbjct 213 AAATAATGT-ACGGGTGAGATGCATGA 238

>emb|FN598996.1| Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, isolate 9840-15, clone 62C
Length=798

Score = 38.2 bits (19), Expect = 1.0
Identities = 26/27 (96%), Gaps = 1/27 (4%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAATAATGTTACGGGTGAGATGCATGA 27
Sbjct 458 AAATAATGT-ACGGGTGAGATGCATGA 483

>gb|FJ007376.1| Trypanosoma cruzi clone 129-c102 minicircle, partial sequence;
kinetoplast
Length=367

Score = 38.2 bits (19), Expect = 1.0
Identities = 26/27 (96%), Gaps = 1/27 (4%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAATAATGTTACGGGTGAGATGCATGA 27
Sbjct 296 AAATAATGT-ACGGGTGAGATGCATGA 321

>emb|FN397828.1| Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, patient 55, clone c168
Length=367

Score = 38.2 bits (19), Expect = 1.0
Identities = 26/27 (96%), Gaps = 1/27 (4%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAATAATGTTACGGGTGAGATGCATGA 27
Sbjct 296 AAATAATGT-ACGGGTGAGATGCATGA 321

>emb|FN397824.1| Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, patient 50, clone c120
Length=367

Score = 38.2 bits (19), Expect = 1.0
Identities = 26/27 (96%), Gaps = 1/27 (4%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAATAATGTTACGGGTGAGATGCATGA 27
Sbjct 296 AAATAATGT-ACGGGTGAGATGCATGA 321

5 de 19 17-01-2012 11:38

APÊNDICE Y – ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 121 – 2

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (27 letters)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/BLAST/blastn suite/](#) [Formatting Results - XBUCY48V01N](#)

[Formatting options](#)

[Download](#)

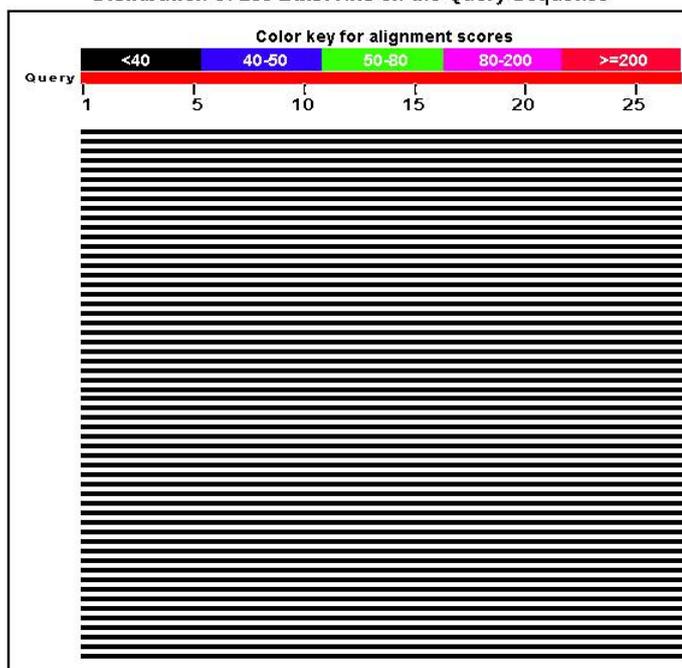
Nucleotide Sequence (27 letters)

Query ID |l|15961
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 27

Database Name nr
Description All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
Program BLASTN 2.2.26+

Graphic Summary

Distribution of 103 Blast Hits on the Query Sequence



APÊNDICE Y – ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 121 – 2
(CONTINUAÇÃO)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (27 letters) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⊖ Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|---|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------|
| FR719709.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 4938, clone V16 | 38.2 | 74.3 | 100% | 1.1 | 100% | |
| FR719697.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9813, clone 44C | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| FR719696.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 149, clone 77XC | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| FR719694.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 3817, clone 51XC | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| FN397834.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, patient 16, clone c85 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| FN397832.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, patient 27, clone c32 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| FM207325.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle and ORF c186 DNA, patient 1399_26, clone 186 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| FM207312.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, ORF1c161 and ORF2c161 DNA, patient 1386_19, clone 161 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| FM207258.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, patient 1287_2, clone 37 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| EU605980.1 | Trypanosoma cruzi isolate LBIV minicircle; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| FJ481521.1 | Trypanosoma cruzi strain CBB cl3 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| FJ481520.1 | Trypanosoma cruzi strain SC43 cl1 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| FJ481519.1 | Trypanosoma cruzi strain Cutia cl1 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| EU088401.1 | Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone D9 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| EU088400.1 | Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone D5 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| EU088399.1 | Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone D4 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| EU088398.1 | Trypanosoma cruzi strain CL Brener clone C7 minicircle, partial sequence; kinetoplast | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |

2 de 23 11-06-2012 09:52

APÊNDICE Y – ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 121 – 2
(CONTINUAÇÃO)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (27 letters) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|--|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|-------|
| AJ749034.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage II d, strain Sc43 cl1, isolate JP708 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| AJ749033.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage II d, strain Sc43 cl1, isolate JP707 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| AJ749032.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage II d, strain Sc43 cl1, isolate JP706 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |
| AJ749031.1 | Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage II d, strain Sc43 cl1, isolate JP705 | 38.2 | 38.2 | 100% | 1.1 | 96% | |

New Designing or Testing PCR Primers? Try your

Alignments

>**emb|FR719709.1|** Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 4938, clone V16
Length=693

Sort alignments for this
E value Score Percent
Query start position

Score = 38.2 bits (19), Expect = 1.1
Identities = 26/27 (96%), Gaps = 1/27 (4%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1 AAATAATGTTACGGGGGAGATGCATGA 27
Sbjct 352 AAATAATGT-ACGGGGGAGATGCATGA 377

```

Score = 36.2 bits (18), Expect = 4.2
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 10 TACGGGGGAGATGCATGA 27
Sbjct 7 TACGGGGGAGATGCATGA 24

```

>**emb|FR719697.1|** Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9813, clone 44C
Length=625

Score = 38.2 bits (19), Expect = 1.1
Identities = 26/27 (96%), Gaps = 1/27 (4%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1 AAATAATGTTACGGGGGAGATGCATGA 27
Sbjct 319 AAATAATGT-ACGGGGGAGATGCATGA 344

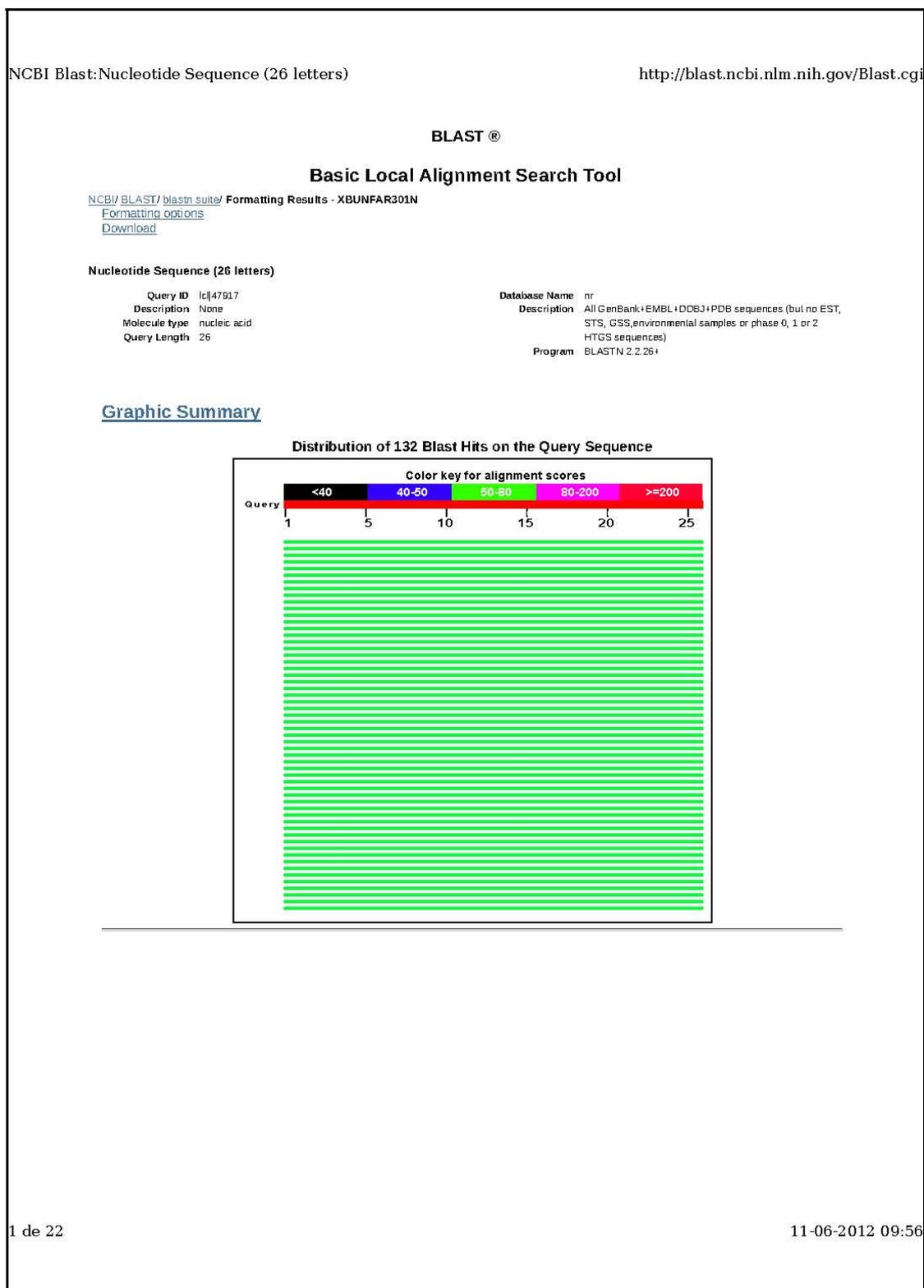
```

>**emb|FR719696.1|** Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 149, clone 77XC
Length=428

Score = 38.2 bits (19), Expect = 1.1

7 de 23 11-06-2012 09:52

APÊNDICE Z - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 122



APÊNDICE Z - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 122
(CONTINUAÇÃO)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (26 letters) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Descriptions
Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|---|----------------------|-------------|----------------|---------|-----------|-------|
| FR719717.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9813, clone V100 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719716.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9813, clone V92 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719715.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9849, clone V68 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719714.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9849, clone V65 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719713.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9849, clone V62 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719712.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 4973, clone V38 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719711.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 4973, clone V32 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719710.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 4938, clone V18 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719709.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 4938, clone V16 | 52.0 | 98.1 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719708.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 4938, clone V4 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719707.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate Pinto07, clone A96 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719706.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate Pinto01, clone A70 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719704.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 3982, clone A1 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719703.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9817, clone G34 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719702.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate Pinto01, clone G13 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719701.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 3691, clone G2 | 52.0 | 156 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719700.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 338, clone 79XC | 52.0 | 104 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719699.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 3982, clone 78C | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719698.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9813, clone 53C | 52.0 | 104 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719697.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9813, clone 44C | 52.0 | 104 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719695.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 3982, clone 74XC | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR719694.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 3817, clone 51XC | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FR681733.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 3982, clone 32C | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FN600557.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9849-12, clone 04C | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FN599000.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, isolate 3882-33, clone G32 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FN598999.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, isolate 3882-33, clone G24 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FN598998.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, isolate 3882-33, clone 45XC | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FN598997.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, isolate 9840-15, clone 66C | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FN598996.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, isolate 9840-15, clone 62C | 52.0 | 104 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FN598993.1 | Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, isolate 9813-14, clone 37C | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |

2 de 22 11-06-2012 09:56

APÊNDICE Z - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR 122
(CONTINUAÇÃO)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (26 letters) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|---|----------------------|-------------|----------------|---------|-----------|-------|
| FM207365.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle and ORF143 DNA, patient 1461_51, clone 143 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FM207364.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle and ORF142 DNA, patient 1461_51, clone 142 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FM207363.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle and ORF140 DNA, patient 1461_51, clone 140 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FM207362.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle and ORF135 DNA, case 1457_50, clone 135 | 52.0 | 150 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FM207361.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, case 1414_48, clone 169 | 52.0 | 52.0 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FM207360.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle and ORF537 DNA, case 1459_46, clone 537 | 52.0 | 188 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FM207359.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle and ORF1c533-ORF3c533 DNA, case 1459_46, clone 533 | 52.0 | 172 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FM207358.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle and ORF1c531-ORF5c531 DNA, case 1459_46, clone 531 | 52.0 | 174 | 100% | 6e-05 | 100% | |
| FM207356.1 | Homo sapiens genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, patient 1466_42, clone 131 | 52.0 | 148 | 100% | 6e-05 | 100% | |

New Designing or Testing PCR Primers? Try your

Alignments

>[emb|FR719717.1|](#) Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9813, clone V100
Length=330
Score = 52.0 bits (26), Expect = 6e-05
Identities = 26/26 (100%), Gaps = 0/26 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1  GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA 26
          |||
Sbjct 330 GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA 305

```

>[emb|FR719716.1|](#) Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9813, clone V92
Length=333
Score = 52.0 bits (26), Expect = 6e-05
Identities = 26/26 (100%), Gaps = 0/26 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1  GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA 26
          |||
Sbjct 333 GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA 308

```

>[emb|FR719715.1|](#) Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9849, clone V68
Length=318
Score = 52.0 bits (26), Expect = 6e-05
Identities = 26/26 (100%), Gaps = 0/26 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1  GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA 26
          |||
Sbjct 318 GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA 293

```

>[emb|FR719714.1|](#) Gallus gallus genomic DNA containing Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA, isolate 9849, clone V65
Length=330
Score = 52.0 bits (26), Expect = 6e-05
Identities = 26/26 (100%), Gaps = 0/26 (0%)

5 de 22 11-06-2012 09:56

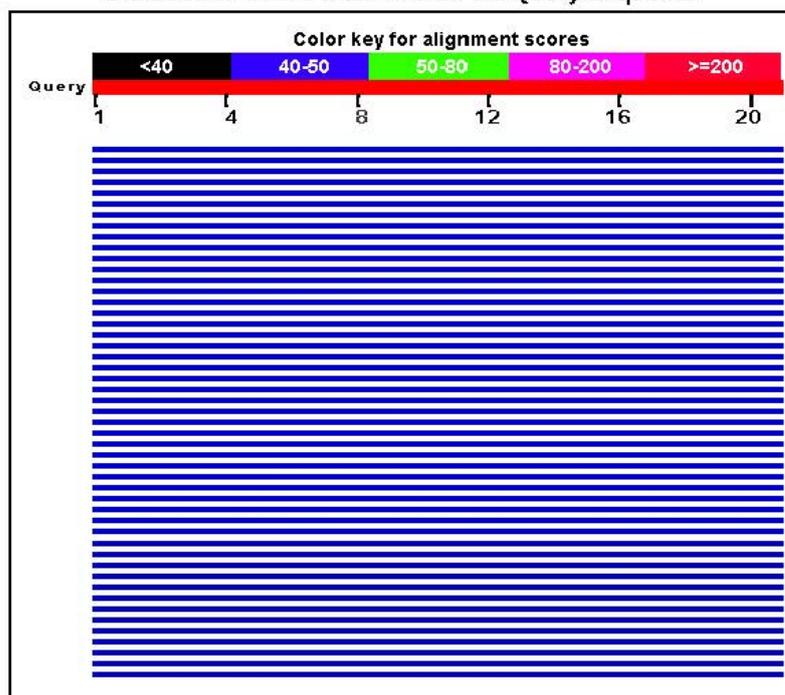
APÊNDICE W - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR DIAZ-7

NCBI Blast: Nucleotide Sequence (21 letters)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>**BLAST®****Basic Local Alignment Search Tool**[NCBI/BLAST/blastn suite/](#) Formatting Results - HAZB426N013[Formatting options](#)[Download](#)**Nucleotide Sequence (21 letters)**

Query ID |cl|18773
 Description |None
 Molecule type |nucleic acid
 Query Length |21

Database Name |nr
 Description |All
 GenBank+EMBL+DBJ+PDB
 sequences (but no EST, STS,
 GSS, environmental samples
 or phase 0, 1 or 2 HTGS
 sequences)
 Program |BLASTN 2.2.26+

Graphic Summary**Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence**

APÊNDICE W - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR DIAZ-7
(CONTINUAÇÃO)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (21 letters) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map
Viewer [B](#) PubChem BioAssay

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|--|----------------------|-------------|----------------|---------|-----------|-------|
| HQ335292.1 | Trypanosoma cruzi isolate PG98 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335291.1 | Trypanosoma cruzi isolate Dm12 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335290.1 | Trypanosoma cruzi isolate Rp523 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335289.1 | Trypanosoma cruzi isolate Dm38 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335288.1 | Trypanosoma cruzi isolate X1084 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335287.1 | Trypanosoma cruzi isolate SN8 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335286.1 | Trypanosoma cruzi isolate N5P14 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335285.1 | Trypanosoma cruzi isolate Dm28 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335284.1 | Trypanosoma cruzi isolate Dm11 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335283.1 | Trypanosoma cruzi isolate Dm7 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335282.1 | Trypanosoma cruzi isolate Coy11 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335281.1 | Trypanosoma cruzi isolate X380 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335280.1 | Trypanosoma cruzi isolate Td11 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335279.1 | Trypanosoma cruzi isolate FEC satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HQ335278.1 | Trypanosoma cruzi isolate SP satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |

3 de 25 17-01-2012 10:58

APÊNDICE W - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR DIAZ-7
(CONTINUAÇÃO)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (21 letters) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|--|----------------------|-------------|----------------|---------|-----------|-------|
| DQ914506.1 | Trypanosoma cruzi clone VL10_1_1 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| DQ914505.1 | Trypanosoma cruzi clone VL10_32_5 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| DQ914504.1 | Trypanosoma cruzi clone VL10_32_4 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| DQ914503.1 | Trypanosoma cruzi clone VL10_32_3 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| DQ914502.1 | Trypanosoma cruzi clone Noel11_2 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| DQ914501.1 | Trypanosoma cruzi clone Noel11_1 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| DQ914500.1 | Trypanosoma cruzi clone Noel8_1 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| DQ914499.1 | Trypanosoma cruzi clone Noel7_2 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| DQ914498.1 | Trypanosoma cruzi clone Noel7_1 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| DQ914497.1 | Trypanosoma cruzi clone Noel6_1 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| DQ914496.1 | Trypanosoma cruzi clone Noel11_3 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| DQ914495.1 | Trypanosoma cruzi clone Roma11_3 satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |

New Designing or Testing PCR Primers? Try your

Alignments

>gb|H0335292.1| Trypanosoma cruzi isolate PG98 satellite sequence

8 de 25 17-01-2012 10:58

APÊNDICE W - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR DIAZ-7
(CONTINUAÇÃO)

```

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (21 letters)                                http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Length=195
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1  CGCAAACAGATATTGACAGAG  21
        |||
Sbjct 2  CGCAAACAGATATTGACAGAG  22

>gb|HQ335291.1| Trypanosoma cruzi isolate Dm12 satellite sequence
Length=195
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1  CGCAAACAGATATTGACAGAG  21
        |||
Sbjct 2  CGCAAACAGATATTGACAGAG  22

>gb|HQ335290.1| Trypanosoma cruzi isolate Rp523 satellite sequence
Length=195
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1  CGCAAACAGATATTGACAGAG  21
        |||
Sbjct 2  CGCAAACAGATATTGACAGAG  22

>gb|HQ335290.1| Trypanosoma cruzi isolate Rp523 satellite sequence
Length=195
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1  CGCAAACAGATATTGACAGAG  21
        |||
Sbjct 2  CGCAAACAGATATTGACAGAG  22

>gb|HQ335289.1| Trypanosoma cruzi isolate Dm38 satellite sequence
Length=195
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1  CGCAAACAGATATTGACAGAG  21
        |||
Sbjct 2  CGCAAACAGATATTGACAGAG  22

>gb|HQ335288.1| Trypanosoma cruzi isolate X1084 satellite sequence
Length=195
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1  CGCAAACAGATATTGACAGAG  21
        |||
Sbjct 2  CGCAAACAGATATTGACAGAG  22

>gb|HQ335287.1| Trypanosoma cruzi isolate SN8 satellite sequence
Length=195
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1  CGCAAACAGATATTGACAGAG  21
        |||
Sbjct 2  CGCAAACAGATATTGACAGAG  22

>gb|HQ335286.1| Trypanosoma cruzi isolate N5P14 satellite sequence
Length=195

```

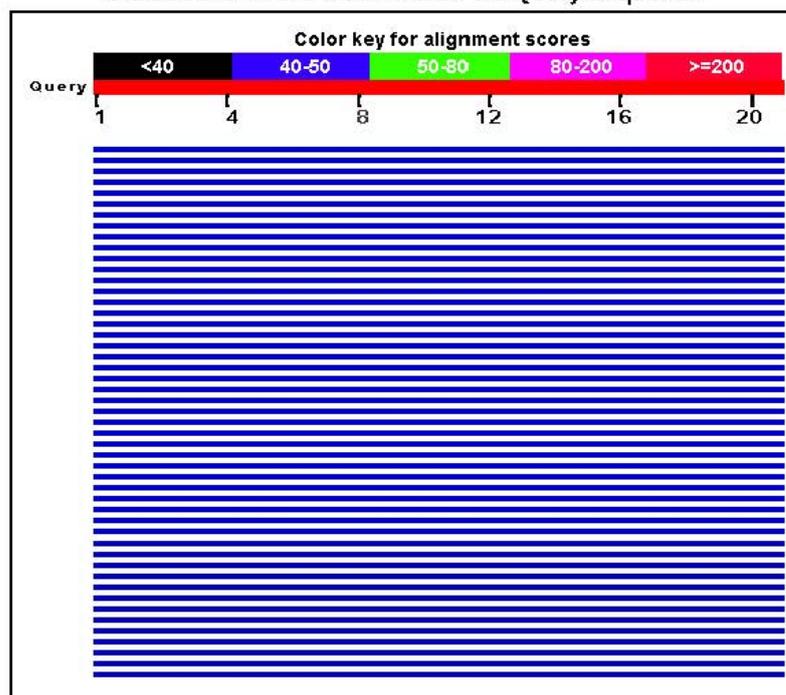
APÊNDICE AA - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR DIAZ-8

NCBI Blast: Nucleotide Sequence (21 letters)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>**BLAST®****Basic Local Alignment Search Tool**[NCBI/BLAST/blastn suite/](#) Formatting Results - HB0SAV8R012[Formatting options](#)[Download](#)**Nucleotide Sequence (21 letters)**

Query ID |cl|37297
 Description |None
 Molecule type |nucleic acid
 Query Length |21

Database Name |nr
 Description |All
 GenBank+EMBL+DDBJ+PDB
 sequences (but no EST, STS,
 GSS, environmental samples
 or phase 0, 1 or 2 HTGS
 sequences)
 Program |BLASTN 2.2.26+

Graphic Summary**Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence**

APÊNDICE AA - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR DIAZ-8
(CONTINUAÇÃO)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (21 letters) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map
Viewer [B](#) PubChem BioAssay

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------|
| HM769805.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769804.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769803.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769802.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769801.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769800.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769799.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769798.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769797.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769796.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769795.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769794.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769793.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769791.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769792.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769790.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769789.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769788.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769787.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769786.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |
| HM769785.1 | Trypanosoma cruzi satellite sequence | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.025 | 100% | |

3 de 25 17-01-2012 11:23

APÊNDICE AA - ALINHAMENTO (BLASTN-NCBI) PARA O INICIADOR DIAZ-8
(CONTINUAÇÃO)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (21 letters) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Alignments

>gb|HM769805.1| Trypanosoma cruzi satellite sequence
Length=195

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TGTTCACACACTGGACACCAA 21
Sbjct 195 TGTTCACACACTGGACACCAA 175

>gb|HM769804.1| Trypanosoma cruzi satellite sequence
Length=195

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TGTTCACACACTGGACACCAA 21
Sbjct 195 TGTTCACACACTGGACACCAA 175

>gb|HM769803.1| Trypanosoma cruzi satellite sequence
Length=195

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TGTTCACACACTGGACACCAA 21
Sbjct 195 TGTTCACACACTGGACACCAA 175

>gb|HM769802.1| Trypanosoma cruzi satellite sequence
Length=195

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TGTTCACACACTGGACACCAA 21
Sbjct 195 TGTTCACACACTGGACACCAA 175

>gb|HM769801.1| Trypanosoma cruzi satellite sequence
Length=195

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TGTTCACACACTGGACACCAA 21
Sbjct 195 TGTTCACACACTGGACACCAA 175

>gb|HM769800.1| Trypanosoma cruzi satellite sequence
Length=195

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.025
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TGTTCACACACTGGACACCAA 21
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

9 de 25 17-01-2012 11:23

ANEXO A – NOTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – HUWC / UFC

HUWC/UFC
Comitê de Ética em Pesquisa
Cód CEP- 052.06.10



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE
FONE: (85) 3366-8589 / 3366-8613 E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 052.06.10

Pesquisador Responsável: Allan Rodrigo Soares Maia

Departamento / Serviço:

Título do Projeto: “**Deteção do Trypanossoma cruzi em sangue periférico de pacientes com doença de chagas crônica, utilizando a reação em cadeia de polimerase (PCR): análise comparativa com sorologia e xenodiagnóstico**”.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou na reunião do dia 28/06/2010 o projeto de pesquisa supracitado e baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), resolveu classificá-lo como: **APROVADO**.

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista:28/06/2011).

Fortaleza, 30 de junho de 2010


Dra. Maria de Fátima de Souza
Coordenadora do CEP - HUWC

ANEXO B – MAPA DAS MACRORREGIÕES DO ESTADO DO CEARÁ (2011)

