

EVELYN ELAINE COSTA

**Diagnóstico Molecular da Infecção Natural por Tripanossomatídeos
em Amostras de Fezes de Triatomíneos**

Orientadora: Prof^a. Dr^a Karin Kirchgatter

Co-orientadora: Biol. Eliana Ferreira Monteiro

São Paulo

2021

EVELYN ELAINE COSTA

**Diagnóstico Molecular da Infecção Natural por Tripanossomatídeos
em Amostras de Fezes de Triatomíneos**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado a Superintendência de Controle de Endemias, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Karin Kirchgatter

Co-orientadora: Biol. Eliana Ferreira Monteiro

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Costa, Evelyn Elaine

Diagnóstico molecular da infecção natural por tripanossomatídeos em amostras de fezes de triatômicos / Evelyn Elaine Costa. – 2021.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários .

Orientação: Prof. Dr. Karin Kirchgatter.

Co-orientador: Biol. Eliana Ferreira Monteiro

1. Diagnóstico.
2. Reação em cadeia da polimerase.
3. Tripanosomatina.
4. Doença de chagas.

SES/CCD/SUCEN - 100/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli 8/9275

Dedico esta monografia à minha
mãe. Pelo exemplo de coragem, fé
e perseverança.
Por me incentivar e nunca desistir
de mim.

Agradecimentos

Quero agradecer a Deus por permitir esta grande oportunidade em minha vida, por me amparar nos momentos difíceis.

Agradeço à minha Orientadora Dr^a Karin Kirchgatter com quem aprendi o valor da pesquisa, sou muito grata por ter concedido a oportunidade, a paciência, ajuda e os grandes ensinamentos. Obrigada por acreditar em mim!

A Dr^a Roseli Tuan, pela oportunidade e acreditar no meu potencial.

Ao Dr^o Rubens Antônio da Silva, por ter nos concedido as amostras necessárias a este estudo, pelas ideias, auxílio pela ajuda com os cálculos, me permitiram a conclusão deste trabalho.

A minha Co-orientadora, Bióloga Eliana Ferreira Monteiro pela inspiração, pela grande colaboração durante o processo de evolução desta pesquisa, pela paciência, ensinamento e amizade.

A Bióloga Vera Braga Toniatti, do laboratório da SUCEN junto por me ensinar a técnica de exame direto e pelo carinho com que me recebeu.

A técnica Maria Regina de Jesus Eleutério do laboratório da SUCEN de Mogi Guaçu por me ajudar na pesquisa de campo e pelo carinho com que me recebeu.

A minha amiga Bióloga Roseli França Simões, por ter me incentivado a participar do processo seletivo desta Especialização, e que acreditou em mim, sou grata pelo seu apoio e amizade!

A todos meus colegas da SUCEN, Bruno da Silva Mathias, Carolina Clares dos Anjos e Dr^a Lilian de Oliveira Guimarães que me ensinaram, ajudaram, auxiliaram em cada etapa do processo da minha pesquisa.

A minha mãe Emilia Maria de Souza, que sempre acreditou em mim, me apoiou em todas as etapas deste processo de evolução profissional.

Muito obrigada a todos vocês que me ajudaram a me reconstruir profissionalmente!

Costa, Evelyn Elaine. **Diagnóstico Molecular da Infecção Natural por Tripanossomatídeos em Amostras de Fezes de Triatomíneos**. XXp. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; SUCEN, São Paulo, 2021.

RESUMO

A Doença de Chagas (DC) é uma doença parasitária ocasionada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. É endêmica em 21 países das Américas, e afeta milhões de pessoas no mundo. A transmissão vetorial possui relevância epidemiológica devido à variedade de espécies de triatomíneos. No Estado de São Paulo as espécies de triatomíneos, também conhecidos como “barbeiros”, mais frequentes são *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius neglectus* e *Triatoma tibiamaculata*. Durante o repasto sanguíneo os barbeiros liberam suas fezes, que podem conter o *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemoflagelado identificado pela presença do cinetoplasto, uma organela localizada na base do flagelo que contém o DNA mitocondrial. Tendo em vista a importância da vigilância epidemiológica dos vetores, este estudo visou avaliar um método mais sensível para o diagnóstico da infecção natural nas fezes de triatomíneos por tripanossomatídeos, buscando aprimorar as ações de vigilância da DC no Estado de São Paulo. Mais especificamente, o objetivo foi diagnosticar a infecção natural por tripanossomatídeos em amostras de fezes de triatomíneos, através da padronização do uso de papel de filtro aliado à aplicação de técnicas moleculares. Além disso, a sensibilidade da técnica molecular foi comparada com o exame direto na detecção de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos que são coletados vivos, bem como nos que chegam no laboratório secos. Foram analisadas 126 amostras de fezes de triatomíneos obtidas de 14 municípios do Estado de São Paulo no período de abril a setembro de 2020. A reação de PCR teve como alvo o gene citocromo b (*cytb*) do *Trypanosoma cruzi*. A positividade obtida no exame direto foi comparada à da PCR através do teste qui-quadrado e a concordância entre os dois métodos foi avaliada por Kappa. O exame direto apresentou positividade de 1,72% e o teste molecular 4,31%. Na comparação, observamos porcentagem de detecção de 100% para a PCR e de 40% para o exame direto, demonstrando que o diagnóstico molecular apresenta sensibilidade superior quando comparado ao exame direto. Para as amostras de triatomíneos secos, o teste molecular apresentou baixa sensibilidade de detecção e necessita ser adequado. Como esperado, o teste molecular mostrou-se mais sensível para detecção de tripanossomatídeos em fezes frescas de triatomíneos e pode auxiliar na vigilância da Doença de Chagas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. DOENÇA DE CHAGAS	7
1.2. TRIATOMÍNEOS DE IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA	8
1.3. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	10
1.4. EXAME DAS FEZES FRESCAS E CORADAS	10
1.5. DNA MITOCONDRIAL	11
2. OBJETIVO GERAL	12
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. AMOSTRAS	13
3.2. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO NATURAL EM TRIATOMÍNEOS	14
3.2.1. Extração de gDNA	14
3.2.2. Validação do Protocolo de Extração	15
3.2.3. PCR e Sequenciamento de <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE FEZES DE TRIATOMÍNEOS	17
4.2. DETECÇÃO DA PRESENÇA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EM AMOSTRAS DE FEZES DE TRIATOMÍNEOS	17
4.3. ANÁLISE MOLECULAR EM AMOSTRAS DE BARBEIROS SECOS	20
5. CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE CHAGAS

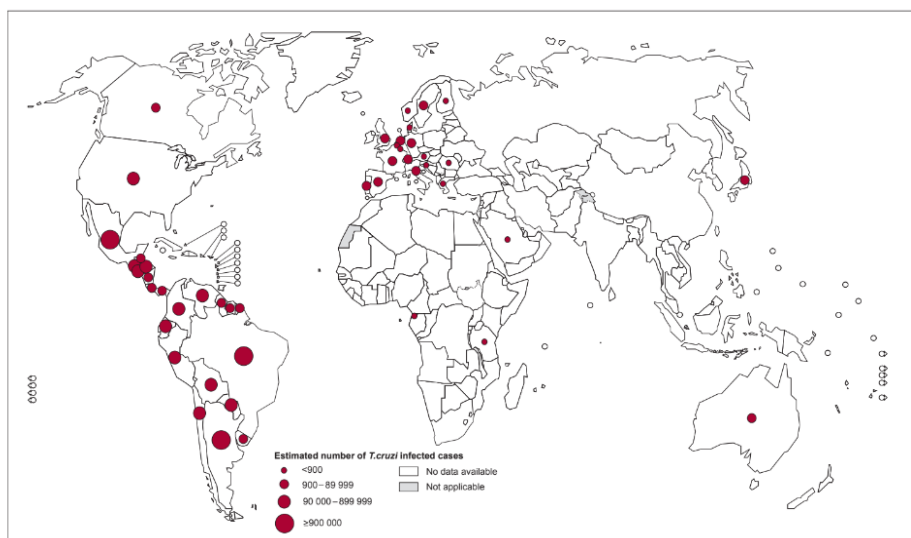
A Doença de Chagas é uma doença parasitária ocasionada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Em 1909, o médico Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, identificou no tubo digestivo de “chupões” ou “barbeiros” uma forma flagelada e decidiu enviar amostras desses insetos infectados ao laboratório de Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, onde se confirmou a suspeita sobre essa nova forma flagelada que estava circulando entre os invertebrados e vertebrados. Este protozoário encontrado foi denominado de *Trypanosoma cruzi*, fazendo uma homenagem a Oswaldo Cruz, e assim a doença passou a ser chamada de Doença de Chagas (DC). Este fato se tornou histórico, porque Chagas descobriu e descreveu como se dava o processo de transmissão da entrada no organismo; vetor e características clínicas desta nova doença (Costa *et al.*, 2013).

Embora tenha sido descrita em 1909, estudos de paleoparasitologia recuperaram DNA de *T. cruzi* em amostras de tecido de múmias, indicando que a DC é uma infecção antiga que aflige o homem há mais de 9.000 anos (Rassi *et al.*, 2010).

A DC, também nomeada tripanossomíase americana, é endêmica em 21 países das Américas (Figura 1) (WHOa, 2018). Apesar da Bolívia ter altas taxas de incidência e prevalência, o maior número de indivíduos que vivem com DC residem no Brasil, Argentina e Colômbia e este fato está diretamente relacionado às moradias em áreas rurais, pois o vetor prospera em áreas onde há más condições de moradia (Echavarría *et al.*, 2019).

A DC é apontada entre as 20 doenças tropicais negligenciadas (Martins-Melo *et al.*, 2018). A estimativa é que aproximadamente 70 milhões de pessoas vivem em locais de risco para a infecção, e de 6 a 7 milhões de pessoas estão acometidas no mundo. No Brasil com incidência anual de 30 mil novos casos, ocasionando em média 14 mil mortes e 8 mil recém-nascidos infectados durante a gestação (Ministério da Saúde, 2020).

Figura 1. Distribuição Global dos casos de Doença de Chagas, baseado nas estimativas oficiais, 2018 (WHOb, 2018).



1.2. TRIATOMÍNEOS DE IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

Os triatomíneos são insetos de grande importância médica por atuarem como vetores do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas (DC) (Oliveira *et al.*, 2016), sendo necessária uma constante vigilância epidemiológica e entomológica dos vetores nela envolvidos (Coura & Viñas, 2010). São insetos da subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) restritos a hematofagia (Carcavallo *et al.*, 1998). O ciclo evolutivo é caracterizado por fases de ovo, ninfa e adulto (Monteiro *et al.*, 2015), sendo necessário, para a troca de um estágio a outro, de ao menos uma refeição (Junqueira *et al.*, 2011).

Estão descritas mais de 150 espécies, distribuídas em 5 tribos 19 gêneros (Corrêa-do-Nascimento *et al.*, 2020; Poinar, 2019). No Brasil, existem cerca de 66 espécies distribuídas em todos os estados brasileiros, (Oliveira *et al.*, 2018) dentre eles são conhecidos com capacidade vetorial para transmissão de *T. cruzi* as seguintes espécies: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* (Silveira & Martins, 2014).

No Brasil, as espécies que são epidemiologicamente mais importantes devido ao perfil comportamental são, *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *T. brasiliensis* (Neiva,

1911), *T. pseudomaculata* (Corrêa & Espínola, 1964), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e *Rhodnius robustus* (Larrousse, 1927) (Galvão *et al.*, 2003; Jurberg *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2013), sendo que o *Triatoma infestans* que já foi considerado o principal vetor da DC teve sua transmissão vetorial interrompida devido a programas de controle realizados no país (Silva, 2006).

As espécies de triatomíneos encontradas com mais frequência no Estado de São Paulo são: *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius neglectus* e *Triatoma tibiamaculata* (Silva *et al.*, 2020).

No Estado de São Paulo, as espécies *T. sordida* e *R. neglectus* são dispersas na região do planalto paulista; *P. megistus* é encontrado nas regiões de Mata Atlântica e na Encosta Ocidental da Mantiqueira, em municípios que fazem divisa com o Estado de Minas Gerais; *T. tibiamaculata* são coletados constantemente na região do litoral paulista, em área de Mata Atlântica (Silva *et al.*, 2011). *Triatoma sordida*, descrita por Stal em 1859, predomina nos cerrados invadem habitações apoiado por biótopos silvestres (Diotaiuti, 1991). A proliferação do triatomíneo está associada a mudanças na economia, às péssimas condições de moradia, desmatamento e ao aumento da urbanização, que são resultado da interferência humana no meio ambiente (Argolo *et al.*, 2008). Se abrigam geralmente em fendas na parede e teto de casas de pau-a-pique e residências precárias da área rural, locais mal iluminados, terrenos abandonados, comunidades periféricas e, em locais de criação de animais. Essa dinâmica contribuiu para que o agente etiológico, que antes era mantido em área silvestre, tenha se deslocado para ambientes domiciliares e peri domicílios (Argolo *et al.*, 2008; Vinhaes & Dias, 2000), ocasionando o espalhamento da DC para áreas não endêmicas nas últimas duas décadas (Figura 1) (Bocchi *et al.*, 2017).

Devido a sua proximidade e, as elevadas taxas de infecção pelo *T. cruzi*, *Panstrongylus megistus* descrito por Burmeister em 1835, é uma das espécies de maior interesse epidemiológico por ser capaz de colonizar o intra e o peridomicílio. Foram relatados pela primeira vez na região metropolitana de São Paulo no município de Carapicuíba em 2018 (Silva, *et al.*, 2020).

1.3. TRYPANOSOMA CRUZI

O *T. cruzi* é um protozoário de importância médica pertencente à Ordem Kinetoplastida que compreende protozoários hemoflagelados (Dias e Coura, 1997). É identificado pela presença do cinetoplasto, uma organela localizada na base do flagelo que contém o DNA mitocondrial. Esse cinetoplasto se excede na membrana parasitária por ser volumoso, permitindo a distinção entre *T. rangeli* (AARAS *et al.*, 2003; SANTOS, 2019).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* no vetor inicia quando as formas tripomastigotas ingeridas no repasto sofrem transformação em epimastigotas e se multiplicam no decorrer no intestino médio e, ao atingir o intestino posterior se transformam em tripomastigotas metacíclicos infectantes ao ser humano que são eliminados nas fezes durante os repastos sanguíneos seguintes (Costa *et al.*, 2013; Rey, 2001). Alguns triatomíneos possuem um fator hemolítico no sistema digestório que lisa as hemácias reduzindo a infecção parasitária, fazendo com que o inseto seja refratário ao contágio parcial ou total por *T. cruzi* (Brener, 1997).

1.4. EXAME DAS FEZES FRESCAS E CORADAS

Para o diagnóstico da infecção natural de tripanossomatídeos em barbeiros é amplamente aplicada a metodologia da leitura de lâminas das fezes frescas e coradas destes insetos (Urdaneta-Morales, 2014). A obtenção do conteúdo fecal do triatomíneo é realizada através de uma delicada compressão no abdômen do inseto dependendo do estado do exemplar, sem sacrifício do mesmo. O material obtido do intestino posterior (aproximadamente um terço do material) é misturado a uma gota de solução fisiológica em lâmina limpa e seca.

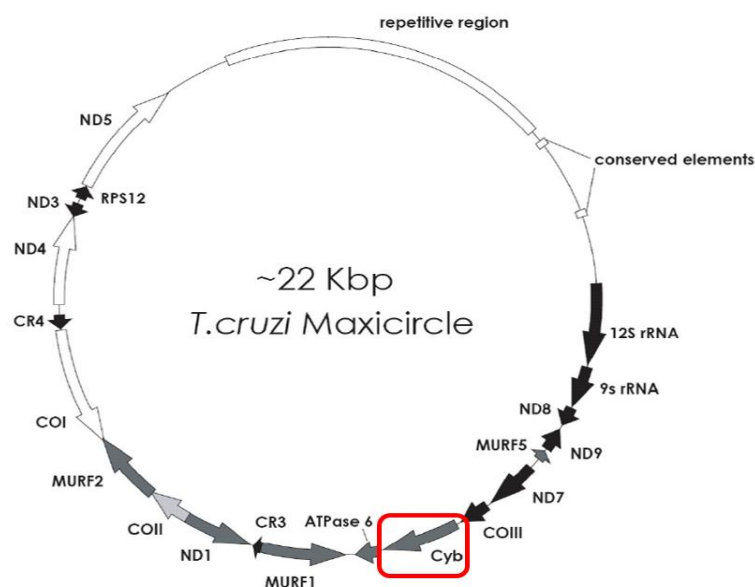
Para os barbeiros secos que chegam ao laboratório, é necessário re-hidratar o inseto para facilitar a coleta das fezes, para isso é aplicada solução fisiológica no abdômen posterior do triatomíneo com o auxílio de uma seringa, e o material é coletado em cerca de três a vinte minutos após a reidratação.

1.5. DNA MITOCONDRIAL

Os tripanossomatídeos apresentam uma única mitocôndria que possuem moléculas circulares de DNA, mais conhecido como uma rede gigante de DNAs circulares, sendo composta por vários milhares de minicírculos interligados, formando algumas dezenas de maxicírculos. O DNA do cinetoplasto (kDNA) é o DNA mitocondrial mas estruturalmente complexo da natureza (Luke *et al.*, 2002). A função dos maxicírculos de kDNA, é codificar alguns produtos gênicos, como rRNA e subunidades de complexos respiratórios (Klingbeil & Englund, 2004).

A ausência de recombinação no DNA mitocondrial e sua alta taxa de evolução heterogênea entre seus genes, fazem com que seja um excelente marcador para taxonomia e estudos filogenéticos. Alguns genes acumulam mutações mais rapidamente, como os genes codificadores das subunidades da NADH Desidrogenase e Citocromo Oxidase C (CO), enquanto os genes Citocromo B (*cytb*), alvo do nosso trabalho (Figura 2), estão entre os mais conservados (Meyer, 1993). Aliado a isso, os minicírculos de kDNA apresentam um grande número de cópias (10^4) e polimorfismo entre espécies e isolados, sendo excelente alvo para diagnóstico por PCR (Marcili, 2008).

Figura 2. Esquema do maxicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi*, destacando o gene citocromo b (*cytb*) (Westenberger *et al.*, 2006).



Por ser uma zoonose complexa, a DC não está incluída no grupo das doenças erradicadas, uma vez que a transmissão do *T. cruzi* acontece no ambiente silvestre entre reservatórios e vetores em ecótopos naturais, sempre haverá a possibilidade de ocorrer infecção acidental e reativação da transmissão domiciliar a partir de focos silvestres, evidenciando a importância da vigilância epidemiológica.

2. OBJETIVO GERAL

Diagnosticar através da técnica molecular, a infecção natural por tripanosomatídeos em amostras de fezes de triatomíneos e comparar com o exame direto.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar uma técnica molecular para extração de DNA de fezes de triatomíneos;
- Detectar a presença de tripanosomatídeos em amostras de fezes de triatomíneos com técnica molecular e comparar os resultados obtidos com o exame direto;
- Comparar a sensibilidade da técnica molecular versus o exame direto na detecção de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos secos.

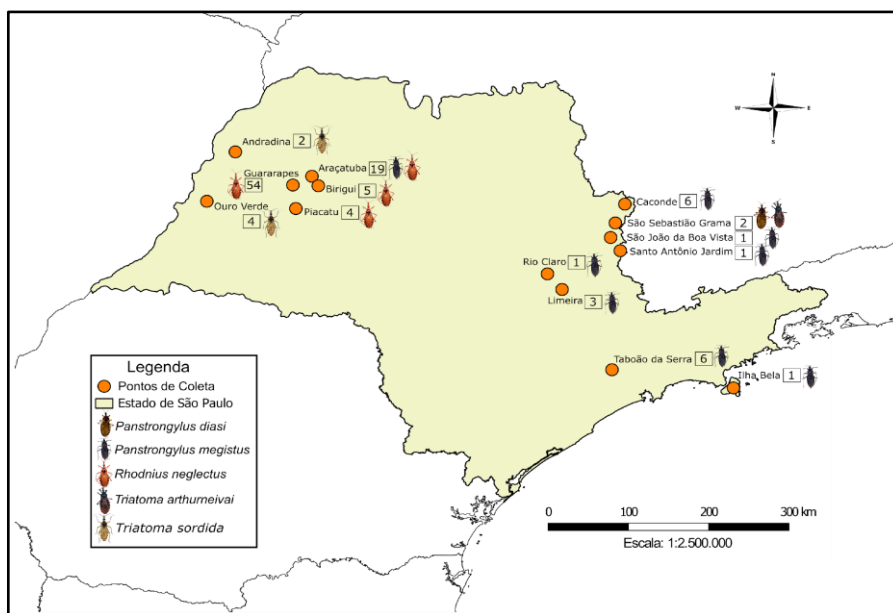
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS

Neste estudo foram analisadas 126 amostras de fezes de triatomíneos de cinco espécies, sendo: *Panstrongylus diasi*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius neglectus*, *Triatoma arthurneivai* e *Triatoma sordida*, que foram obtidas de 14 municípios do Estado de São Paulo (Figura 3) coletadas no período de abril a setembro de 2020. Desse total, 116 amostras de fezes frescas pertenciam a barbeiros que apresentavam conteúdo intestinal que permitiu extrair suas fezes diretamente em papel filtro. Outras 10 amostras foram extraídas de animais secos que não apresentavam conteúdo intestinal aparente para extração, mas eram sabidamente positivos para *T. cruzi*.

A identificação morfológica das espécies de triatomíneos foi realizada pela equipe do Laboratório de Parasitoses por Flagelados da SUCEN de Mogi-Guaçu, SP, utilizando as chaves dicotômicas de Lent & Wygodzinski (1979) e Carcavallo e colaboradores (1997). Onde coletaram conteúdo fecal, fizeram o Exame Direto das amostras e nos enviaram absorvidas em papel filtro 3M Whatman® para facilitar a conservação e o transporte dessas amostras.

Figura 3. Procedência das amostras de fezes de triatomíneos no Estado de São Paulo



3.2. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO NATURAL EM TRIATOMÍNEOS

3.2.1. Extração de gDNA

As amostras de fezes impregnadas em papel 3M Whatman foram extraídas em duas etapas de Pré-lise e Extração, realizadas com a utilização do tampão ASL (i) (*Stool Lysis Buffer*) e com o Kit *DNeasy Blood & Tissue* (ii) (Qiagen, Germantown, Maryland), conforme descrito a seguir.

Para a pré-lise, cada amostra em papel de filtro foi colocada em tubo de 2 ml e submersa em 220 µl de tampão ASL (i). A suspensão foi aquecida em ThermoShaker na velocidade de 400rpm, por 15 minutos à 70°C. As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente até atingir cerca de 56°C para então adicionarmos 20 µl de Proteinase K e 200 µl de tampão AL (ii), e deixadas por 2 horas sob agitação de 400rpm em ThermoShaker à 56°C, e em seguida resfriada novamente em temperatura ambiente e deixada sob agitação de 400rpm em ThermoShaker à 37°C overnight.

As amostras foram avaliadas após a incubação overnight e aquelas que ainda estavam escurecidas foi realizada a limpeza para eliminar possíveis inibidores de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), e para isso foi acrescentado ¼ do comprimido Inhibitex (i) homogeneizado continuamente (1 minuto) e incubado a temperatura ambiente (1 minuto), após foi centrifugado por 3 minutos em velocidade máxima (13.000 rpm), ao final todo o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Na etapa de extração, as amostras foram retiradas do ThermoShaker e adicionamos 200 µl de etanol (96 a 100%), foram homogeneizadas e centrifugadas por 1 minuto na velocidade máxima (13.000 rpm). Em seguida, a parte líquida de cada amostra foi transferida para a coluna com tubo coletor do kit (ii) e prosseguimos com as lavagens, adicionando 500 µl de cada tampão de lavagem AW1 e AW2 (ii) e a eluição do gDNA foi feita com 100 µl de tampão AE (ii), conforme instruções do fabricante.

3.2.2. Validação do Protocolo de Extração

A padronização do protocolo de extração foi validada utilizando 10% do nosso total de amostras (12 amostras) selecionadas aleatoriamente no conjunto de amostras. Essa etapa foi indispensável para assegurar a ausência de inibidores nas amostras extraídas que poderiam interferir nas análises por PCR. Para isso, realizamos uma reação de PCR com *primers* específicos para amplificar o DNA do hospedeiro. A reação foi conduzida fazendo uso dos *primers* ND5_F (5-TCC TTA GAA TAA AAT CCC GC-3) e ND5_R (5-GTT TCT GCT TTA GTT CAT TCT TC-3), em volume final de 25 µl contendo as seguintes concentrações de reagentes: 2,5 mM de MgCl₂; 1X de PCR Buffer (tampão); 0,2 mM de cada dNTP; 0,4 µM de cada *primer*; 0,4 unidades de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Invitrogen); e 5 µl de gDNA. As condições de ciclagem foram as seguintes: 94°C por 5'; 35 ciclos de amplificação: 94°C por 30"; 46°C por 30"; 72°C por 45"; e um alongamento final de 72°C durante 10'; originando um fragmento de ~449 bp (Birungi & Munstermann, 2002).

3.2.3. PCR e Sequenciamento de *Trypanosoma cruzi*

A reação de PCR para o gene citocromo b (*cytb*) para *Trypanosoma cruzi* foi realizada utilizando os primers p18 (GAC AGG ATT GAG AAG CGA GAG AG) e p20 (CAA ACC TAT CAC AAA AAG CAT CTG) (Brisse *et al.*, 2003) em um volume final de 25 µl contendo 0,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 0,1 nM de cada dNTP, 0,2 mM de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂, tampão 1X, e 5 µl de gDNA. A ciclagem foi realizada de acordo com o protocolo da (Brisse *et al.*, 1998): 94°C por 5'; 35 ciclos de amplificação: 94°C por 1'; 50°C por 30"; 72°C por 90"; e um alongamento final de 72°C durante 5'; originando um fragmento de ~722 bp.

Os fragmentos obtidos na amplificação por PCR foram analisados em gel de Agarose 1% (Sigma Aldrich), utilizando 10 µl de amplificado, 2 µl de Loading Buffer 6X (Sinapse) e 1 µl Gel Red (Biotium).

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™), conforme instruções do fabricante, e as leituras foram realizadas em equipamento multiusuário localizado no Laboratório

de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical – IMT/USP, no Sequenciador ABI PRISM[®] 3500 Genetic Analyser (ABI, USA). As sequências obtidas foram analisadas através da base de dados genéticos GenBank[®] para a confirmação das sequências de *T. cruzi* encontradas nas amostras positivas.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no PCR foram comparados com os resultados pré-existent no Exame Direto por teste qui-quadrado. A concordância entre os dois métodos foi avaliada por Kappa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE FEZES DE TRIATOMÍNEOS

Para a concretização da análise molecular é necessário que o DNA esteja puro, íntegro e em grande quantidade após passar por um processo de extração. Quando é testado um protocolo se espera obter DNA de boa qualidade, pois uma das maiores limitações das três características inicialmente citadas, e obter resultado desejado na PCR é a presença de inibidores na amostra que promovem falso negativo e a inibição da *Taq* polimerase (Bergallo, 2006).

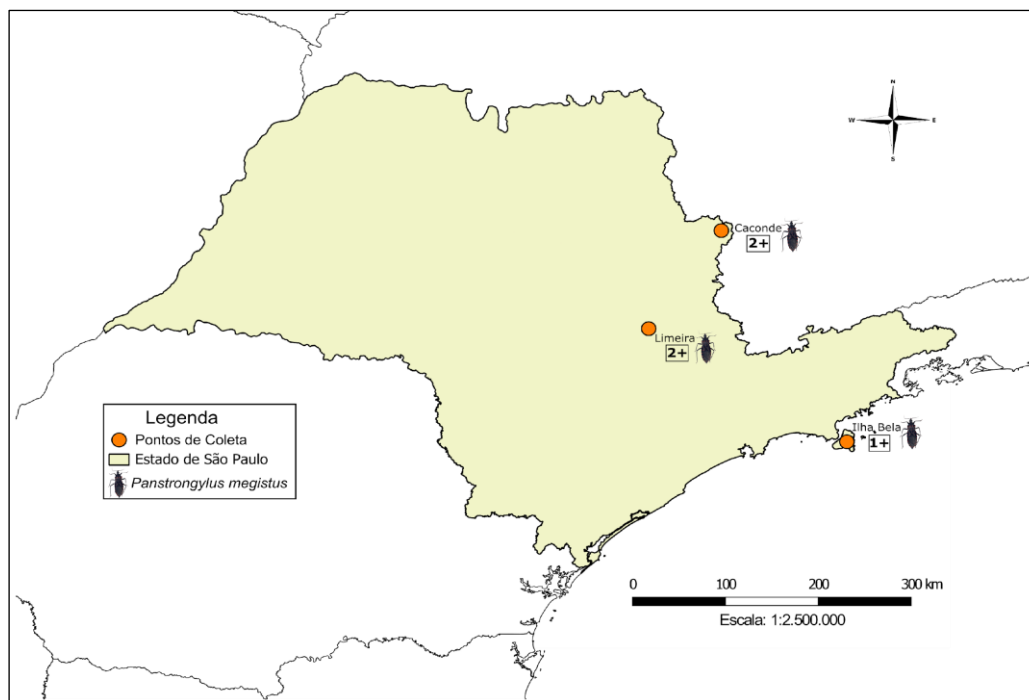
Dessa forma, seguimos com a extração de fezes de triatomíneos de Papel Filtro 3M (Whatman®) sendo esta técnica validada inicialmente com a realização de PCR que detecta a presença de DNA do hospedeiro em todas as amostras utilizadas para esta padronização (n=12) e demonstrou a ausência de possíveis inibidores.

A validação desta metodologia foi uma etapa importante, uma vez que a dificuldade operacional no transporte de triatomíneos vivos até o laboratório pode acarretar na perda de um percentual variável de espécimes (Pinho, 2012). Esta análise prévia foi essencial, pois permitiu o prosseguimento das análises seguintes com segurança.

4.2. DETECÇÃO DA PRESENÇA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM AMOSTRAS DE FEZES DE TRIATOMÍNEOS

Foram analisadas 116 amostras de fezes de triatomíneos coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo. Nossos resultados no teste molecular apresentaram positividade de 4,31% (5/116), indicando a presença de *T. cruzi* nas fezes da espécie *Panstrongylus megistus* em três municípios do Estado de São Paulo (Figura 4), enquanto que o exame direto possui positividade de 1,72% (2/116) para a mesma espécie de triatomíneo no município de Caconde – SP.

Figura 4. Municípios onde foi detectado positividade de *Trypanosoma cruzi*.



A concordância relativa entre o Exame Direto (ED) e o PCR foi alta (97%), por isso, visando avaliar o nível de concordância e/ou reprodutibilidade entre os testes, também realizamos o cálculo do Coeficiente *Kappa* (-1 a 1), – que compara a concordância relativa com a concordância randômica – pois é considerado um dado conservador. Para isso foi elaborada a tabela de contingência (Tabela 1) e através dos valores obtidos realizamos os cálculos dispostos no Quadro 1.

Tabela 1. Tabela de Contingência para cálculo do Coeficiente *Kappa*

		PCR			
		Positivo	Negativo	Total	%
Exame Direto	Positivo	2	0	2	0,017
	Negativo	3	111	114	0,983
	Total	5	111	116	
	%	0,043	0,957		

Quadro 1. Equações para Coeficiente *Kappa*

Concordância relativa: $p_0 = (2+111) / 116 = 0,97$

Probabilidade de Positivos = (% Positivos ED) x (% Positivos PCR) = $0,017 \times 0,043 = 0,0007$

Probabilidade de Negativos = (% Positivos ED) x (% Positivos PCR) = $0,983 \times 0,957 = 0,9404$

Concordância randômica: $p_e = \text{Prob. Positivos} + \text{Prob. Negativos} = 0,0007 + 0,9404 = 0,94$

Kappa = $(p_0 - p_e) / (1 - p_e) = (0,97 - 0,94) / (1 - 0,94) = 0,56$

Na comparação observamos alta porcentagem de detecção (100%) para a PCR em comparação ao Exame Direto (40%) (Tabela 2), embora não tenha demonstrado significância estatística ($p=0,44$), apresentando valor de Qui-Quadrado com correção de Yates de 0,59. Acreditamos que esta baixa significância estatística possa ter sido influenciada pela pequena quantidade de positivos presentes em nosso N amostral. A concordância de *Kappa* foi moderada (0,56) entre as técnicas de exame direto e PCR, demonstrando que há diferença entre as técnicas, devido à maior sensibilidade do PCR.

Tabela 2. Detecção e concordância das técnicas de microscopia óptica e PCR para diagnóstico da infecção por *T. cruzi* no conteúdo intestinal de triatomíneos

	PCR+		PCR-		% Detecção		Concordância <i>Kappa</i>
	ED +	ED -	ED +	ED -	PCR	ED	
Amostras de fezes de triatomíneos	2	3	0	111	100%	40%	0,56
Total	116						

ED = Exame Direto

A técnica molecular empregada neste estudo permite analisar o conteúdo de diferentes sítios anatômicos do tubo digestivo do inseto, como reto, intestino e estômago, como forma de aumentar a sensibilidade dos ensaios diagnósticos, uma vez que este protocolo detecta exclusivamente o kDNA de *T. cruzi*.

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas sensibilidades das técnicas, o teste molecular demonstrou reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo exame direto, acrescido de sensibilidade superior. Estes dados sugerem que a PCR pode ser aplicada em inquéritos epidemiológicos de

campo, visando estimar as taxas de infecção natural dos triatomíneos por *T. cruzi* coletados em diferentes ecótopos.

4.3. ANÁLISE MOLECULAR EM AMOSTRAS DE BARBEIROS SECOS

Foram obtidas 10 amostras de barbeiros secos que apresentaram resultado positivo na leitura das fezes em lâmina, a fim de realizarmos a comparação dessa técnica com o teste molecular. Essa condição do hospedeiro invertebrado dificulta o diagnóstico no exame direto, que é realizado basicamente pela observação da movimentação ativa dos flagelados. Entretanto, os nossos resultados não foram satisfatórios, pois o teste molecular apresentou baixa sensibilidade de detecção de *T. cruzi* nas amostras deste grupo, com positividade de 20% das amostras (2/10).

Estudos demonstraram o uso da PCR na análise de fezes secas ou manchas fecais de triatomíneos em paredes de domicílios que albergam estes insetos. O estudo de Russomando e colaboradores (1996) demonstrou ser possível a detecção de *T. cruzi* por PCR em manchas fecais secas de triatomíneos coletadas em domicílios através de papel de filtro. De maneira similar, a técnica molecular também foi aplicada, tendo como alvo o kDNA de *T. cruzi*, em amostras coletadas em domicílios (paredes das residências) e se demonstrou ser uma ferramenta eficaz na detecção do tripanossoma, comprovando que o DNA de *T. cruzi* ainda estava viável mesmo após 26 semanas da exposição das fezes ao ambiente (Hamano *et al.*, 2001).

Dessa forma, acreditamos que a necessidade de reidratar o abdômen posterior do triatomíneo com volume maior de solução fisiológica, em comparação ao volume desta solução utilizada nas fezes dos insetos vivos implica na diluição da amostra de fezes, que pode acarretar na perda da sensibilidade do teste molecular. Embora ainda haja necessidade de mais estudos que possibilitem estabelecer um protocolo mais sensível que possibilite a detecção de *T. cruzi* em triatomíneos secos.

Estabelecer um protocolo que possibilite a realização das análises neste grupo é de extrema importância para evitar perda de amostras, visto que, em alguns estudos, estes triatomíneos acabam sendo removidos das análises por não apresentarem condições de serem examinados (Assis, 2006; Fernandes & Costa, 2012).

5. CONCLUSÃO

A detecção de *T. cruzi* nas fezes de triatomíneos coletadas em papel filtro é viável, facilitando o transporte e armazenamento dessas amostras para posterior processamento.

A detecção de *T. cruzi* em fezes de triatomíneos empregando PCR apresenta sensibilidade superior quando comparada à microscopia.

As análises das fezes de triatomíneos secos apresentaram baixa sensibilidade, necessitando ser aprimorada.

A PCR utilizando *cytb* para detecção de *T. cruzi* em fezes de triatomíneos pode auxiliar na vigilância da Doença de Chagas no Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

- Aaras R, Gomes I, Veiga M, Melo A. Transmissão vetorial da doença de Chagas em Mulungu do Morro, Nordeste do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36: 359-63.
- Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008.
- Assis G.F.M. Avaliação do programa de controle da Doença de Chagas no Município de Berílio, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil, oito anos após a implantação da vigilância epidemiológica. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, 2006.
- Azambuja P, Garcia ES, Waniek PJ, Vieira CS, Figueiredo MB, Gonzalez MS, Mello CB, Castro DP, Ratcliffe NA. *Rhodnius prolixus*: from physiology by Wigglesworth to recent studies of immune system modulation by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Insect Physiology*, v.97, p.45-65, Nov, 2017.
- Birungi J, Munstermann LE. Genetic structure of *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: Evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Annals of the Entomological Society of America*. 95. 130-132, 2002.
- Bocchi EA, Bestetti RB, Scanavacca MI, Cunha Neto E, Issa VS. Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(12):1510-1524.
- Bergallo M, Costa C, Gribaudo G, Tarallo S, Baro S, Ponzi NA, Cavallo R. Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *New Microbiol*. 2006; 29: 111-9.
- Brener, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo, In: Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, Cap. 2, p. 26-31, 1997.
- Brisse S, Barnabé C, Bañuls AL, Sidibé I, Noël S, Tibayrenc M. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol. Biochem. Parasitol*. 92, 253–263, 1998.
- .Brisse S, Henriksson J, Barnabé C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. Evidência para troca genética e hibridização em *Trypanosoma cruzi* baseada em sequências de nucleotídeos e cariótipo molecular. *Infect Genet Evol*. Fevereiro de 2003; 2 (3): 173-83. doi: 10.1016 / s1567-1348 (02) 00097-7. PMID: 12797979.
- Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas, v. II. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 394-733, 1997.
- Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H. Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas, v. III. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 1217, 1998.
- Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1: 159-218, 1909.
- Corrêa-do-Nascimento Guilherme Sanches, Moreira Danielle de Oliveira, Galvão Cleber, Santos Claudiney Biral dos, Falqueto Aloísio, Leite Gustavo Rocha. A redescoberta de *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) no estado do Espírito Santo, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [Internet]. 2021 [citado em 24 de fevereiro de 2021]; 54: e03232020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822021000100611&lng=en. Epub em 21 de dezembro de 2020. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0323-2020>.
- Costa M, Tavares VR, Aquino MVM, Moreira DB. Doença de Chagas: Uma revisão Bibliográfica, v. 2 n. 1 *REFACER*, 2013.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010 Jun 24;465(7301):S6-7. doi: 10.1038/nature09221.
- Dias JCP, and Coura, JR. org. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p. ISBN 85-85676- 31-0. Available from SciELO Books.
- Diotaiuti L. Importância atual e perspectivas de controle de *Triatoma sordida* em Minas Gerais. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1991.
- Echavarría NG, Echeverría LE, Stewart M, Gallego C, Saldarriaga C. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy [published online ahead of print, 2019 Dec 1]. *Curr Probl Cardiol*. 2019;100507. doi:10.1016/j.cpcardiol.2019.100507, 2019.

- Fernandes HM, Costa C. Índice de triatomíneos positivos para *Trypanosoma cruzi*, em Monte Carmelo (MG), no período de 2005 a 2009. GETEC, v.1, n.1, p.59-69, 2012.
- GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.U.; ROCHA, D.S. & JURBERG, J. (2003) A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa 202: 1-36.
- GONÇALVES, T.C.M.; TEVES-NEVES, S.C.; SANTOS-MALLET, J.R.; CARBAJAL-DELA-FUENTE, A.L. & LOPES, C.M. (2013) *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2013, vol.108, n.4
- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: uma revisão atualizada. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 4, pág. 435-442, junho de 2003.
- 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. *Parasitol Int*. 2001 Jul;50(2):135-8.
- Junqueira ACV, Gonçalves TCM, Moreira CJC. Manual de capacitação na detecção de *trypanosoma cruzi* para microscopistas de malária e laboratoristas da rede pública, Rio de Janeiro, 2ªed, 300pp, 2011.
- JURBERG, J.; ROCHA, D.S. & GALVÃO, C. (2009) *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotropica* 9: 123-128
- Klingbeil MM, Englund PT. The gaps in Kinetoplast DNA network replicaton. *Proc Natl Acad Sci USA*. ; 101:4333-4, 2004.
- Lent H, Wygodzinski P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist*, 1979.
- Lukes J, Guilbride DL, Voty'pka J, Zikova A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Euk. Cell.*, v. 1, p. 495- 502, 2002.
- Marçili A. *Trypanosoma cruzi*: Diversidade, relações filogenéticas e padrões ecogeográficos de isolados silvestres. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- Martins-Melo FR, Carneiro M, Ramos AN Jr, Heukelbach J, Ribeiro ALP, Werneck GL. The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12(6): e0006559, 2018.
- Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka and Mommsen, *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol.2. Elsevier, 1993.
- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. *Bol Epidemiol*, 2020.
- Monteiro ACB, Dorigatti DH, Rodrigues AG, Silva JBM. Doença de Chagas: Uma Enfermidade descoberta por um Brasileiro. *Saúde em Foco*, Edição 07, 2015.
- Oliveira JCP, Palmeira PA, Barbosa VSA. Diversidade, prevalência e infecção natural por tripanossomatídeos em triatomíneos (Hemiptera: reduviidae) do curimataú e seridó paraibanos / Diversity, prevalence and natural infection of triatomines (hemiptera: reduviidae) by trypanosomatids in the regions of Curimataú and Seridó in Paraíba, Brazil. *Rev. patol. trop* ; 45(2): 212-226, jun, 2016.
- Oliveira J, Ayala JM, Justi SA, Rosa JA, Galvão C. Descrição de uma nova espécie de *Nesotriatoma* Usinger, 1944 de Cuba e revalidação da sinonímia entre *Nesotriatoma bruneri* (Usinger, 1944) e *N. flavida* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *J Vect Ecol* 43:148-157, 2018.
- Pinho IF. Diagnóstico molecular da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos nativos de área endêmica para doença de Chagas no estado do Ceará. Dissertação (Mestre em Ciências), Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.
- Poinar Jr G (2019) A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxagen*. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. *Cretaceous Research* 93, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2018.09.004>
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Doença de Chagas. *Lancet*; 375 (9723): 1388-402, 2010.
- Rey L. *Parasitologia*. 3º ed. Guanabara Koogan, 884p, 2001.
- Russomando G, Rojas de Arias A, Almiron M, Figueredo A, Ferreira ME, Morita K. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol*. 1996 Jun;83(1):62-6.
- Santos EJ. Análise da herança do DNA do *Trypanosoma cruzi* em parentais e progênes de chagásicos de famílias de São Felipe – Bahia. 2019. 106 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.
- Silva TPT. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, n.5, 2006.

- Silva EOR, Rodrigues VLCC, Silva RA, Wanderley DMV. Programa de Controle da Doença de Chagas no estado de São Paulo, Brasil: o controle e a vigilância da transmissão vetorial. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 44, supl. 2, p. 74-84, 2011.
- Silva RA, Estevao VAO, Duarte EAN, MARIA PC. Colonization by *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in an urban park in the city of São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.54, 2020.
- Silveira AC, Martins E. Histórico do controle da transmissão vetorial e situação epidemiológica atual. In: Galvão C, organizador. *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia; Cap. 2, p. 10-25, 2014.
- Urdaneta-Morales S. Chagas' disease: an emergent urban zoonosis. The caracas valley (Venezuela) as an epidemiological model. *Front Public Health*. 2014;2:265. doi:10.3389/fpubh.2014.00265, 2014.
- Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, de Sánchez N. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus* [Behavior of the infection and morphologic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*]. *Rev Bras Biol*. 1988 Aug;48(3):577-87. Spanish. PMID: 3070649.
- Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro,16 (Sup.2):7-12, 2000.
- Westenberger SJ, Cerqueira GC, El-Sayed NM, Zingales B, Campbell DA, Sturm NR. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *BMC Genomics*. 2006; 7:60. Published 2006 Mar 22. doi:10.1186/1471-2164-7-60
- WHOa. World Health Organization. Chagas Disease in the Americas: A Review of the Current Public Health Situation and a Vision for the Future. report: Conclusions and recommendations Washington, D.C., 3-4 May 2018.
- WHOb. World Health Organization. Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018. docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2.