

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Mestrado em Medicina Tropical

**Diagnóstico molecular da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos
nativos de área endêmica para doença de Chagas no estado do Ceará**

IRLANE FARIA DE PINHO

Rio de Janeiro

2012

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Mestrado em Medicina Tropical

IRLANE FARIA DE PINHO

**Diagnóstico molecular da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos
nativos de área endêmica para doença de Chagas no estado do Ceará**

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências, área de concentração:
Medicina Tropical

Orientadores: Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

Dra. Raquel da Silva Pacheco

Rio de Janeiro

2012

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Mestrado em Medicina Tropical

IRLANE FARIA DE PINHO

**Diagnóstico molecular da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos
nativos de área endêmica para doença de Chagas no estado do Ceará**

Orientadores: Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

Dra. Raquel da Silva Pacheco

Dissertação apresentada e aprovada em 09 de abril de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Marli Maria Lima – IOC/Lab de Eco-Epidemiologia de Doença de Chagas

Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet – IOC/Lab de Transmissores de Leishmaniose

Dra. Fernanda Santos de Oliveira – IOC/Lab de Sistemática e Bioquímica

Rio de Janeiro

2012

iii

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria, por este fato, de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa, para quem não há agradecimentos que cheguem. As notas dominantes da sua orientação foram a utilidade das suas recomendações e a cordialidade com que sempre me recebeu. Estou grata também pela liberdade de ação que me foi permitida, sendo decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal. Como professor foi o expoente máximo, abriu-me horizontes, ensinou-me principalmente a pensar. Foi, e é fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus pequenos sucessos.

A Dra. Raquel Pacheco pela inspiração, apoio, pelas idéias apresentadas, que facilitaram o alcance dos objetivos propostos nesta dissertação. Pela afabilidade e gentileza que me dispensou sempre que a procurei.

Ao meu esposo Alexandre, o qual amo sem medidas, agradeço todo o seu amor, carinho, admiração, e pela presença incansável com que me apoiou ao longo do período de elaboração desta dissertação ajudando com nosso bebê para que eu pudesse dar continuidade ao meu mestrado.

À Dra. Otilia Sarquis, à Dra. Marli Lima e à Sra. Tânia agradeço o modo como se disponibilizaram no auxílio dos trabalhos. As colegas do laboratório que tanto me apoiaram e me ajudaram. Agradeço a amizade e o carinho que sempre me disponibilizaram.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, pela amizade e companheirismo.

À minha mãe, pela sólida formação dada até a minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada ao mestrado. Além disso, me ajudou cuidando das minhas filhas enquanto eu freqüentava as aulas do mestrado e o laboratório. Por esta tarefa, também agradeço à minha sogra Glória. Sem vocês eu não teria conseguido, não teria chegado onde cheguei, os meus eternos agradecimentos.

A todos, obrigada por permitirem que esta dissertação seja uma realidade.

RESUMO

A taxa de infecção por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos é um importante parâmetro para a avaliação do risco de transmissão vetorial da doença de Chagas em localidades onde há infestação doméstica e peridoméstica por estes insetos. A infecção por *T. cruzi* em insetos vetores costuma ser avaliada pelo exame, através de microscopia óptica, de suspensões do conteúdo intestinal fresco dos insetos, buscando-se nelas a presença de tripanossomatídeos flagelados. Esta metodologia apresenta como desvantagens a necessidade de se transportar os insetos vivos até o laboratório, além de não permitir a identificação da espécie de tripanossomatídeo presente nas fezes dos triatomíneos. Técnicas de biologia molecular baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm, portanto, sido desenvolvidas para a identificação de *T. cruzi* em amostras biológicas, como o conteúdo intestinal dos triatomíneos. O objetivo desta dissertação foi avaliar a aplicabilidade e a sensibilidade de uma técnica de diagnóstico molecular da infecção natural por *T. cruzi*, baseada na utilização de papel de filtro, em triatomíneos capturados no estado do Ceará. Adicionalmente, procurou-se avaliar esta técnica diagnóstica em amostras do conteúdo intestinal de triatomíneos criopreservadas em papel de filtro durante 11 anos. Foram estudados os conteúdos intestinais de 68 espécimes de triatomíneos capturados no ano de 2000 (*Rhodnius nasutus*, n=40; *Triatoma pseudomaculata*, n=25 e *T. brasiliensis*, n=3), além de fezes de 51 espécimes coletados no ano de 2010 (*T. pseudomaculata*, n=15; *T. brasiliensis*, n=36). Os conteúdos intestinais obtidos por compressão abdominal dos 119 triatomíneos foram analisados pelo exame direto por microscopia óptica. As fezes foram diluídas sobre as lâminas de microscopia, em solução salina tamponada, cobertas com lamínulas e examinadas no microscópio óptico com aumento de 400 vezes, para observação direta da presença de tripanossomatídeos. Alíquotas das suspensões fecais foram separadas e aplicadas em tiras de papel de filtro (FTA Card, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), que foram armazenadas individualmente em tubos de 2 mL e acondicionadas em freezer a -20 °C, para utilização na técnica de PCR, visando a detecção de kDNA de *T. cruzi*. Empregaram-se os iniciadores S35 5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3', e S36 5'-GGTTGCATTGGGTTGGTGTAAATATA-3', que amplificam o fragmento de 330 pares de bases contendo as regiões variáveis dos minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA). O cálculo comparativo das sensibilidades das técnicas diagnósticas (microscopia óptica e PCR) foi realizado da seguinte forma: sensibilidade da técnica = número de exames positivos por esta técnica / número de exames positivos em quaisquer das duas técnicas. Com relação à análise dos 68 conteúdos intestinais criopreservados em papel FTA Card, 58 foram positivos pela microscopia óptica. Destes, 56 foram positivos pela PCR. Obteve-se, desta forma, uma sensibilidade comparativa de 96,5% para a PCR e 100% para a microscopia óptica. Analisando-se as 51 amostras fecais recém-obtidas de triatomíneos, obteve-se uma positividade, pela microscopia óptica, de quatro amostras e, pela PCR, de 14 amostras, obtendo-se uma sensibilidade de 100% para a PCR e de 28,6% para a microscopia óptica. A concordância entre as técnicas foi de 66/68 (97%) para as amostras criopreservadas e de 41/51 (80,4%) para as amostras recém-obtidas de insetos. Analisando-se as amostras em conjunto, obtivemos uma concordância de 107/119 (89,9%) entre as técnicas. O estudo conclui que a técnica de diagnóstico por PCR em amostras de conteúdo intestinal de triatomíneos aplicadas ao papel FTA Card é aplicável para a estimativa das taxas de infecção natural destes insetos pelo *T. cruzi*, sendo capaz de auxiliar a caracterização de perfis eco-epidemiológicos e a detecção da circulação do parasita em ambientes silvestres, peridomésticos e domésticos, contribuindo também para a avaliação do risco de transmissão da doença de Chagas em localidades onde há infestação pelos vetores.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Chagas, triatomíneos, FTA Card, PCR, diagnóstico molecular, diagnóstico parasitológico.

ABSTRACT

The rate of infection by *Trypanosoma cruzi* in triatomines is an important parameter for assessing the risk of vectorial transmission of Chagas disease in localities where domestic and peridomestic infestation by these insects are found. Infection with *T. cruzi* in triatomines is usually evaluated by examining, by light microscopy, suspensions of intestinal contents of fresh insects, seeking in them the presence of flagellate trypanosomatids. This approach has disadvantages as the need to transport the live insects to the laboratory, and not allow the identification of the trypanosomatid species present in the triatomine feces. Molecular biology techniques based on polymerase chain reaction (PCR) have therefore been developed to identify *T. cruzi* in biological samples, such as the intestinal contents of triatomines. The aim of this study was to evaluate the applicability and sensitivity of the technique of molecular diagnosis of natural infection by *T. cruzi*, based on the use of filter paper in triatomines captured in the Ceará state. Additionally, we sought to evaluate this diagnostic technique in samples of intestinal content of triatomines cryopreserved on filter paper for 11 years. We studied the intestinal contents of 68 specimens of insects captured in the year 2000 (*Rhodnius nasutus*, n = 40; *T. pseudomaculata*, n = 25 and *T. brasiliensis*, n = 3), and feces from 51 specimens collected in 2010 (*T. pseudomaculata*, n = 25; *T. brasiliensis*, n = 36). The intestinal content obtained by abdominal compression of 119 insects were analyzed by direct examination through optical microscopy. The feces were diluted on microscope slides in buffered saline (pH = 7.0), covered with coverslips and examined under optical microscope with 400 times magnification for direct observation of the trypanosomes presence. Aliquots of fecal suspensions were separated and applied to strips of filter paper (FTA Card, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), which were stored individually in 2 mL tubes and stored at -20 ° C for use in PCR, aimed at detection of kDNA of *T. cruzi*. The primers used were 5'-AAATAATGTACGGG S35 (T / G) GAGATGCATGA-3' and 5'-GGTTGCATTGGGTTGGTGTAAATATA S36-3', which amplify a fragment of 330 base pairs containing the hypervariable regions of the k-DNA minicircles. The comparative calculation of the sensitivity of diagnostic techniques (optical microscopy and PCR) was performed as follows: sensitivity = number of technical tests positive by this technique / number of positive tests in any of the two techniques. Regarding the analysis of 68 cryopreserved paper intestinal contents FTA Card, 58 were positive by light microscopy. Of these, 56 were positive by PCR. Was obtained in this way, a comparative sensitivity of 96.5% for PCR and 100% for light microscopy. Analyzing the newly obtained 51 fecal samples of insects, we obtained a positivity by light microscopy, four samples and PCR of 14 samples, yielding a sensitivity of 100% for PCR and 28.6% for optical microscopy. The agreement between the techniques was 66/68 (97%) for the cryopreserved samples and 41/51 (80.4%) for the newly obtained samples of insects. Analyzing the samples together, we achieved an agreement of 107/119 (89.9%) between the techniques. The study concludes that the technique of PCR for diagnosis in samples of intestinal content of triatomines applied to FTA paper Card is applicable for estimating natural infection rates of these insects by *T. cruzi*, is able to assist the characterization of eco-epidemiological profiles and the detection of the parasite in the wild environment, peridomestic and domestic, also contributing to the assessment of risk of transmission of Chagas disease in localities where there is infestation by vectors.

KEY WORDS: Chagas Disease, triatomine, FTA Card, PCR, molecular diagnostic, parasitologic diagnostic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo do <i>T. cruzi</i> nos hospedeiros invertebrados e vertebrados com suas respectivas formas de parasitismo. (Cambridge University Press, 2002).....	20
Figura 5.1. Distribuição das espécies de triatomíneos coletados, de acordo com as nove localidades do município de Jaguaruana e Russas, Ceará.....	31
Figura 5.2 Distribuição dos triatomíneos de acordo com os estágios e sexo das três espécies durante todo o período estudado.....	31
Figura 5.3. Distribuição por espécie dos triatomíneos naturalmente infectados pelo <i>T. cruzi</i> , analisados por exame direto de suspensões do conteúdo intestinal através de microscopia óptica durante todo o período estudado.....	32
Figura 5.4. Gel de Agarose 1,8% mostrando as bandas diagnósticas de 330 pb após amplificação pela PCR de amostras fecais de <i>T. pseudomaculata</i> positivas para <i>T. cruzi</i> . (A, B e C), Marcador – 100 Base-Pair DNA Ladder (Ge Healthcare), C+ (controle positivo) utilizado <i>Cl-Brener</i> e C – (controle negativo) utilizado água <i>DNA-RNA free</i>	35
Figura 5.5. Gel de Agarose 1,8%, mostrando as bandas diagnósticas de 330 pb após amplificação pela PCR de amostras fecais de <i>R. nasutus</i> positivas para <i>T. cruzi</i> (B e C). Amostras negativas para <i>T. cruzi</i> (A). Marcador – 100 Base-Pair DNA Ladder (Ge Healthcare), C+ (controle positivo) utilizado <i>Cl-Brener</i> e C – (controle negativo) utilizado água <i>DNA-RNA free</i>	35
Figura 5.6. Gel de Agarose 1,8% mostrando a presença de algumas bandas diagnósticas de 330 pb após amplificação pela PCR de amostras fecais de <i>T. brasiliensis</i> positivas para <i>T. cruzi</i> . (B e C), Amostras negativas para <i>T. cruzi</i> (A). Marcador – 100 Base-Pair DNA Ladder (Ge Healthcare), C+ (controle positivo) utilizado <i>Cl-Brener</i> e C – (controle negativo) utilizado água <i>DNA-RNA free</i>	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Sensibilidade e concordância das técnicas de microscopia óptica e PCR para diagnóstico da infecção por *T. cruzi* no conteúdo intestinal de triatomíneos capturados no município de Jaguaruana e Russas, estado do Ceará no ano de 2000. As amostras foram criopreservadas e a análise por PCR realizada no ano de 2011. MO = microscopia óptica..... 34

Tabela 5.2. Sensibilidade e concordância das técnicas de microscopia óptica e PCR para diagnóstico da infecção por *T. cruzi* no conteúdo intestinal de triatomíneos capturados no município de Jaguaruana e Russas, estado do Ceará no ano de 2010. MO = microscopia óptica..... 34

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	10
1.1. A Doença de Chagas: alguns aspectos de importância biológica e epidemiológica.....	10
1.2. Os vetores da doença de Chagas: considerações gerais.....	15
1.3. Características da transmissão vetorial doença de Chagas na região Nordeste do Brasil, com ênfase para o estado do Ceará.....	16
1.4. O parasito.....	18
1.4.1. O DNA do cinetoplasto (kDNA).....	20
1.5. O diagnóstico molecular da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> em triatomíneos vetores.....	22
2 – JUSTIFICATIVA.....	24
3 – OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo Geral.....	26
3.2. Objetivos Específicos.....	26
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Área de coleta dos triatomíneos.....	27
4.2. Captura de triatomíneos no ambientes intradomiciliar, peridomiciliar e silvestre.....	27
4.3. Processamento inicial de amostras fecais de triatomíneos.....	28
4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico da infecção natural por <i>Trypanosoma cruzi</i> no conteúdo intestinal triatomíneos.....	29
4.5. Eletroforese em gel de agarose.....	30
5 – RESULTADOS.....	31
6 – DISCUSSÃO.....	36
7 – CONCLUSÕES.....	42
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1 - INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Chagas: alguns aspectos de importância biológica e epidemiológica

A doença de Chagas (tripanossomíase americana) é uma parasitose sistêmica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitida ao homem por insetos hematófagos (triatomíneos), através das fezes destes vetores após a picada (Chagas 1909). Reconhecem-se dois ciclos de transmissão de *T. cruzi*: i) um ciclo silvestre que constitui o ciclo original da tripanossomíase americana e no qual participam mais de 200 espécies animais e triatomíneos silvestres e ii) um ciclo doméstico, já bem estudado, do qual participam o homem, animais sinantrópicos e triatomíneos domiciliares. O ciclo doméstico teve sua origem na ocupação pelo homem dos ecótopos silvestres, fazendo-se incluir no ciclo epidemiológico da doença. Assim ofereceu ao vetor abrigo e oferta alimentar abundante nas vivendas rurais de péssima qualidade (Dias & Dias, 1979). Este protozoário pode também ser transmitido de forma congênita, por via parenteral através de hemotransfusões, em acidentes de laboratório ou pela ingestão de alimentos contaminados pelo *T. cruzi*, como tem sido relatado em surtos ocorridos no Brasil (CDC 2006, Pinto et al. 2004).

Embora as formas aguda e crônica da doença de Chagas sejam potencialmente letais, a infecção pelo *T. cruzi* frequentemente é assintomática e evolui para uma fase denominada indeterminada. Aproximadamente 30% dos pacientes evoluem para a forma crônica, caracterizada por miocardite e dilatação de vísceras ocas (Ferreira et al. 2002).

A infecção está associada às duas principais linhagens do parasita, *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII). TcI está envolvido principalmente com o ciclo silvestre de transmissão, possivelmente sendo menos patogênico para o homem com relação à cardiopatia crônica. TcII estaria relacionado ao ciclo doméstico nos países do Cone Sul (Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Chile), sendo capaz de, mais frequentemente, produzir infecção crônica sintomática (Guhl et al. 2009). Uma classificação mais discriminatória foi recentemente

proposta, agrupando os isolados de *T. cruzi* em seis unidades discretas de tipagem (DTUs, sigla em inglês para *discrete typing units*), numeradas TcI a TcVI (Zingales et al. 2009).

Há evidências de que o *T. cruzi* infecte seres humanos a cerca de cinco mil anos A.C., período em que povos andinos podem ter estabelecido uma rota entre o mar e as montanhas. Material genético de *T. cruzi* foi identificado por técnicas de biologia molecular em múmias da época, recuperadas desta região. Neste sentido, tem sido proposto que o centro de dispersão da infecção chagásica tenha sido os Andes, iniciando-se o processo de domiciliação dos vetores em casas muito primitivas, nas quais os moradores desenvolveram o hábito de criar roedores silvestres que trouxeram o parasito para o domínio humano. A transmissão estável da doença de Chagas desenvolveu-se na medida em que o homem aproximou-se dos *habitats* naturais dos triatomíneos, aos poucos propiciando a colonização de sua própria vivenda pelos insetos vetores. Este processo de domiciliação dos vetores do agente etiológico da doença de Chagas foi inicialmente focal, mas com o aumento da densidade demográfica de vastas áreas rurais na América Latina pôde ampliar-se, sempre associado às características dos domicílios, como será discutido adiante (Prata, 2011).

A distribuição e a intensidade da endemia chagásica são fortemente influenciadas pelas condições sanitárias e sociais, especialmente em relação às condições de moradia que propiciam a domiciliação dos triatomíneos. Seu custo social é elevado, particularmente no setor de produção agrícola, de importância estratégica no desenvolvimento econômico e social dos países latino-americanos (Schofield, 1999). No entanto, a comprovada eficácia do uso de inseticidas no controle das populações de vetores domiciliares e peridomiciliares e na interrupção consequente da transmissão do *T. cruzi* ao homem demonstrou que a doença de Chagas representa um problema vulnerável a uma intervenção técnica eficaz a curto e médio prazo (Vinhaes & Dias, 2000).

Mesmo após mais de um século de sua descoberta, a doença de Chagas ainda representa uma importante endemia na América Latina, sendo um dos seus maiores problemas sanitários. Essa situação persiste apesar das medidas de controle terem conseguido diminuir a incidência em aproximadamente 70% nos países do Cone Sul, através da eliminação de colônias domésticas e peridomésticas dos vetores domiciliados e da vigilância dos bancos de sangue (Moncayo & Silveira, 2009; Coura & Viñas, 2010). Estima-se que cerca de nove a dez milhões de pessoas estejam sob o risco de contrair a doença de Chagas, o que coloca a endemia entre as doenças parasitárias mais sérias do hemisfério sul (Moncayo & Silveira, 2009; Coura & Dias, 2009; Dias, 2009).

O controle da transmissão vetorial da doença de Chagas pelo uso de inseticidas de ação residual foi estruturado no Brasil a partir de 1975 (Vinhaes & Dias, 2000). Nessa época, os inquéritos entomológicos e de soroprevalência da infecção na população humana mostraram que: (i) a área de transmissão vetorial onde eram encontrados os triatomíneos domiciliares correspondia a 36% do território nacional (18 estados brasileiros); (ii) trinta espécies de triatomíneos estavam presentes no ambiente domiciliar e, entre elas cinco tinham participação na transmissão domiciliar da infecção (*Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, *Triatoma pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus*); (iii) a prevalência da infecção chagásica na população rural era de 4%.

A “Iniciativa dos Países do Cone Sul” (Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) contra o *T. infestans*, teve a participação do Brasil a partir de 1991. Esta iniciativa conjunta objetivou interromper a transmissão da doença de Chagas através da luta antivetorial e do controle dos centros de transfusão sanguínea (PAHO, 1995). As medidas de controle adotadas vêm apresentando um grande impacto no controle da doença. Vários estados do Brasil já declararam a interrupção da transmissão da tripanosomíase americana. Os indicadores

entomológicos apontam atualmente para a virtual eliminação de *T. infestans*, o principal vetor doméstico no Brasil (Vinhaes & Dias, 2000).

Em várias áreas onde foi efetuado o programa de controle de *T. infestans*, o processo de sucessão ecológica do vetor principal se fez rapidamente por outras espécies de triatomíneos, então restritas aos ecótopos silvestres. As constantes alterações antrópicas ocorridas no ambiente natural (destruição da vegetação pela agricultura) levaram a uma modificação de comportamento dos vetores que passaram a ocupar os nichos deixados vagos pela erradicação de *T. infestans*, possibilitando desta maneira a formação de novos ciclos de transmissão da doença de Chagas com a participação de espécies originalmente silvestres, no peri e intradomicílio (Forattini et al, 1979; Dias, 1988). A invasão, pelos triatomíneos, dos espaços peridomésticos e das habitações humanas é um reflexo à rarefação de seus habitats naturais e de suas fontes de alimentação sanguínea. No Brasil, das 53 espécies de triatomíneos catalogadas, cerca de trinta já foram capturadas no ambiente domiciliar e outras tantas, assinaladas como apresentando risco de domiciliação (Dias, 1988; Vinhaes & Dias, 2000).

Deve ser reconhecido que as ações de vigilância e controle entomológicos aplicadas no Brasil mostraram eficácia no controle da transmissão vetorial da infecção chagásica, resultando na diminuição significativa da incidência de casos humanos e na certificação internacional, por parte da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), o que conferiu ao país o status de zona livre de transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans* (Silveira & Dias, 2011). No entanto, esta eliminação se refere à transmissão da doença de Chagas por apenas um dos vetores, de hábito intradomiciliar. Em algumas regiões do nordeste brasileiro, faz-se necessária a vigilância continuada, tendo em vista a possibilidade de espécies de vetores autóctones, como *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* manterem a transmissão.

A transmissão oral da doença de Chagas ocorre pelo consumo de alimentos contaminados pela presença dos triatomíneos ou suas fezes, ou por ingestão de carne crua de

mamíferos silvestres infectados (Dias, 2006). A atual emergência dos casos de doença de Chagas aguda com possível transmissão oral pode estar fundamentada i) no consumo de alimentos contaminados pela não adoção de boas práticas, ii) na invasão humana de *habitats* silvestres que aumenta os riscos associados à proximidade de vetores e reservatórios silvestres e iii) pela maior capacidade e disponibilidade de diagnóstico, que permite caracterizar casos e surtos (ANVISA, 2008). O primeiro surto de transmissão oral de doença de Chagas no Brasil foi relatado em 1965 (da Silva et al, 1968), sendo relatados também surtos associados ao consumo de caldo de cana (Shikanai-Yasuda et al, 1991; Tatto et al, 2007). Nestes surtos, o período de incubação foi de aproximadamente 22 dias, diferente dos 4 a 15 dias associados a transmissão vetorial (BRASIL, 2009). Casos recentes notificados no Brasil de doença de Chagas aguda estão relacionados ao consumo do suco de açaí fresco, considerado um alimento essencial na dieta da população da Região Norte. A contaminação dos alimentos à base de vegetais *in natura* com *T. cruzi* é acidental e pode ocorrer durante a colheita, armazenamento, transporte ou até mesmo na etapa de preparação. Em 2007, foram divulgadas quatro Notas Técnicas relatando casos de surtos ocorridos na região amazônica pela Secretaria de Vigilância em Saúde, totalizando mais de 100 casos associados à transmissão oral. No ano de 2006, a forma oral foi identificada como de grande importância epidemiológica, quando houve a confirmação de 115 casos de doença de Chagas aguda nas regiões Norte e Nordeste, sendo 94 casos de transmissão pela via oral, devido ao consumo, na maioria dos casos, de açaí contaminado. Registraram-se, também, neste período, surtos pela ingestão de suco de bacaba e de caldo de cana-de-açúcar (ANVISA, 2008).

Dados epidemiológicos brasileiros dos últimos dez anos apontam para a continuidade dos números de casos da doença de Chagas. Nos anos de 2000 a 2010 foram registrados 1.093 casos agudos no Brasil, sendo que a maior parte (71%) ocorreu por transmissão oral devido à ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, entre outros). Mas vale destacar que

são os casos crônicos de doenças de Chagas, decorrentes de infecções adquiridas no passado, que predominam no país, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados (BRASIL, 2011).

1.2. Os vetores da doença de Chagas: considerações gerais

Embora todas as espécies de triatomíneos sejam vetores em potencial do protozoário *T. cruzi*, apenas aquelas que colonizam o domicílio e/ou o peridomicílio reúnem condições necessárias para transmitir a doença de Chagas aos seres humanos. Neste aspecto, os gêneros de maior importância epidemiológica são *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius*. No Brasil já foram catalogadas mais de 42 espécies de triatomíneos, sendo 30 encontradas em ambientes domiciliares, embora apenas cinco apresentem participação direta na transmissão domiciliar da doença: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus* (Silveira & Vinhaes, 1999).

T. infestans foi uma espécie introduzida que chegou passivamente ao Nordeste por volta dos anos 50 e se dispersou com grande rapidez e intensidade entre casarios pobres a partir do sul, via Bahia (Silveira et al., 1984; Dias & Schofield, 1999). Esta espécie está virtualmente eliminada do Nordeste, excetuando-se os focos do oeste da Bahia (Silveira & Vinhaes, 1999).

A espécie *Triatoma brasiliensis* é, segundo Lent & Wygodzinsky (1979), um dos principais vetores da doença de Chagas nas zonas semiáridas do nordeste do Brasil. Estudos morfológicos, biológicos, ecológicos e genéticos em diferentes populações de *T. brasiliensis* coletadas em Caicó (RN), Espinosa (MG), Petrolina (PE) e Juazeiro (BA) já foram reportados (COSTA et al. 1997, 1998). Corrêa & Espínola (1964), mencionam *Triatoma pseudomaculata* como uma espécie de importância regional no nordeste brasileiro, encontrada no peridomicílio em pombais, galinheiros e cercas, distribuída geograficamente pelos estados de

Pernambuco, Paraíba, Ceará, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Piauí e Goiás. Segundo Dias et al. (2000), *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* estão entre as espécies de vetores que apresentam maior importância epidemiológica no nordeste do Brasil, ao lado de *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*. Estas últimas foram mais domiciliadas, causando maior impacto médico-social e têm sido eliminadas mediante controle químico, ao passo que *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, mais frequentemente encontradas no peridomicílio, permanecem como grande desafio operacional.

A espécie *T. brasiliensis* (Silveira et al. 1984), possui ampla distribuição no ambiente silvestre, em nove estados da região nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Sergipe, Maranhão e Rio Grande do Norte), além dos estados de Tocantins e Minas Gerais. Desenvolve-se em temperaturas mais elevadas e em climas mais secos (Forattini, 1980) e encontra-se associado, no ambiente silvestre, a abrigos de mamíferos (roedores, morcegos), aves e marsupiais, transmitindo o *T. cruzi* entre os roedores e marsupiais. Além disso, coloniza bem o domicílio e peridomicílio, sugando o homem e os animais domésticos. No Ceará, foram encontrados vários exemplares de *T. brasiliensis* em locais de pedras, associados a várias espécies de quirópteros e roedores. Esta espécie então considerada de importância secundária no que diz respeito à capacidade vetorial e às medidas de controle, tornou-se, atualmente, uma das prioridades dos órgãos executivos do Ministério da Saúde, por ser considerada o principal vetor da doença de Chagas nas zonas semiáridas do Nordeste do Brasil (Costa, 2000).

1.3. Características da transmissão vetorial doença de Chagas na região Nordeste do Brasil, com ênfase para o Estado do Ceará

Em regiões onde a doença de Chagas é transmitida principalmente por espécies autóctones, não introduzidas, e que, portanto, possuem *habitats* naturais no ambiente silvestre,

a erradicação dos vetores por tratamento químico dos domicílios não é possível (Lima et al, 2012). Este é o caso de vastas áreas do Nordeste brasileiro, incluindo o Estado do Ceará. Nestas áreas, o tratamento químico das habitações poderá ser sempre seguido pela reintrodução, no ambiente doméstico e peridoméstico, de insetos vetores da doença de Chagas, provenientes do ambiente silvestre (Carvalho-Costa et al, 2010; Carbajal-de-La-Fuente et al, 2007

O Nordeste brasileiro é, portanto, uma região onde a doença de Chagas ocorre de forma endêmica. Nela estão assinaladas diferentes regiões fisiográficas que comportam diversas espécies de triatomíneos (Dias et al, 2000). O Estado do Ceará possui uma área de 148.016 km² e apresenta cobertura vegetal predominante de caatingas, possuindo uma vasta área rural, com habitações humanas e hábitos cotidianos que, como relatado acima, propiciam abrigo e mobilização de espécies de triatomíneos. Alencar et al. (1976) demonstraram que, em apenas nove dos 141 municípios do Ceará estes vetores não foram encontrados. De acordo com Dias-Lima & Sherlock (2000), a destruição, ou mesmo a transformação, dos ecótopos naturais podem causar a diminuição ou o desaparecimento das fontes alimentares dos triatomíneos, resultando em pressão de invasão de domicílios e peridomicílios por esses insetos, não somente na busca de complementação ou dieta completa com sangue humano, e/ou de animais domésticos e/ou sinantrópicos, mas também na busca por novos abrigos. Desta forma, a domiciliação de triatomíneos é um comportamento populacional associado ao homem e a dispersão destes insetos deve estar sujeita à atuação deste no meio natural (Forattini, 1980). Alencar et al. (1976) relatam que *Triatoma brasiliensis* é a espécie transmissora mais comum no estado, sendo *Triatoma pseudomaculata* também bastante encontrado, porém em segunda escala. *Rhodnius nasutus* é a espécie com menor taxa de infestação de domicílios e peridomicílios (Freitas, 2005).

O município de Jaguaruana, localizado na região do Baixo Jaguaribe, distante 183 km da capital Fortaleza, sempre esteve no grupo das áreas com as maiores prevalências da infecção chagásica no Estado do Ceará (Borges-Pereira et al, 2008), e estudos realizados por Albuquerque et al. (1942), Bustamante (1956), Silveira et al. (1984), e Alencar (1987) demonstraram que *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Rhodnius nasutus* tem sido encontrados neste município por muito tempo. Além disso, estudos moleculares mais recentes, reportaram a infecção natural por *T. cruzi*, nessa três espécies, em quatro áreas endêmicas do município de Jaguaruana (Pacheco et al, 2005; Brito et al 2008)

1.4. O parasito

O *T. cruzi* é um flagelado da família Trypanosomatidae que parasita mamíferos e tem como hospedeiros invertebrados numerosas espécies de hemípteros hematófagos da família Reduviidae comumente denominados barbeiros. Este protozoário, quando eliminado pelas fezes do triatomíneo, apresenta-se com a forma de uma célula alongada com um flagelo que lhe possibilita o movimento, forma esta denominada tripomastigota. Estes tripomastigotas são chamados metacíclicos, tipo ocorrente no organismo dos triatomíneos. Após a entrada no organismo do hospedeiro vertebrado, ocorre a infecção de células próximas ao local da picada. Dentro da célula, os tripomastigotas assumem uma forma ovóide e sem flagelo, chamada amastigota, a qual se multiplica rapidamente por divisão binária. O grande número de parasitos provoca o rompimento celular penetrando na corrente sanguínea e no sistema linfático. Nesse momento, eles reassumem a forma flagelada, sendo chamados de tripomastigotas sanguíneos, forma parasitária extracelular observada nos hospedeiros vertebrados. Assim, espalham-se pelo organismo e infectam mais células em novos ciclos de replicação, causando lesões principalmente em tecidos musculares cardíacos e lisos, podendo

levar a graves problemas, como a insuficiência cardíaca, e também ao óbito (Dias & Macedo, 2005).

O inseto, ao se alimentar do sangue de vertebrados infectados, ingere os tripomastigotas sanguíneos. No intestino médio do inseto, os tripanossomas vão se transformar na forma epimastigota (exclusiva do hospedeiro invertebrado) e se multiplicar (Moraes et al, 2008). Esta forma é semelhante à tripomastigota, entretanto o cinetoplasto, um orgânulo mitocondrial menor que o núcleo, encontra-se próximo a este.

Nas formas amastigota e epimastigota, o cinetoplasto tem o aspecto de um disco, côncavo na face voltada para o blefaroplasto e convexo do outro lado. Em corte transversal, mostra a estrutura de DNA formada por filamentos densos, dispostos em alças paralelas e apertadas, arrumadas em um ou dois planos. Nos tripomastigotas, o cinetoplasto é maior e encontra-se próximo à extremidade anterior do *T. cruzi*. No intestino posterior do triatomíneo, os epimastigotas se diferenciam para a forma tripomastigota metacíclica, que será eliminada com as fezes e urina do inseto durante o repasto sanguíneo, podendo penetrar no organismo do hospedeiro vertebrado por meio da picada ou mucosas, renovando assim o ciclo de transmissão (**Figura 1.1**) (Rey, 2008).

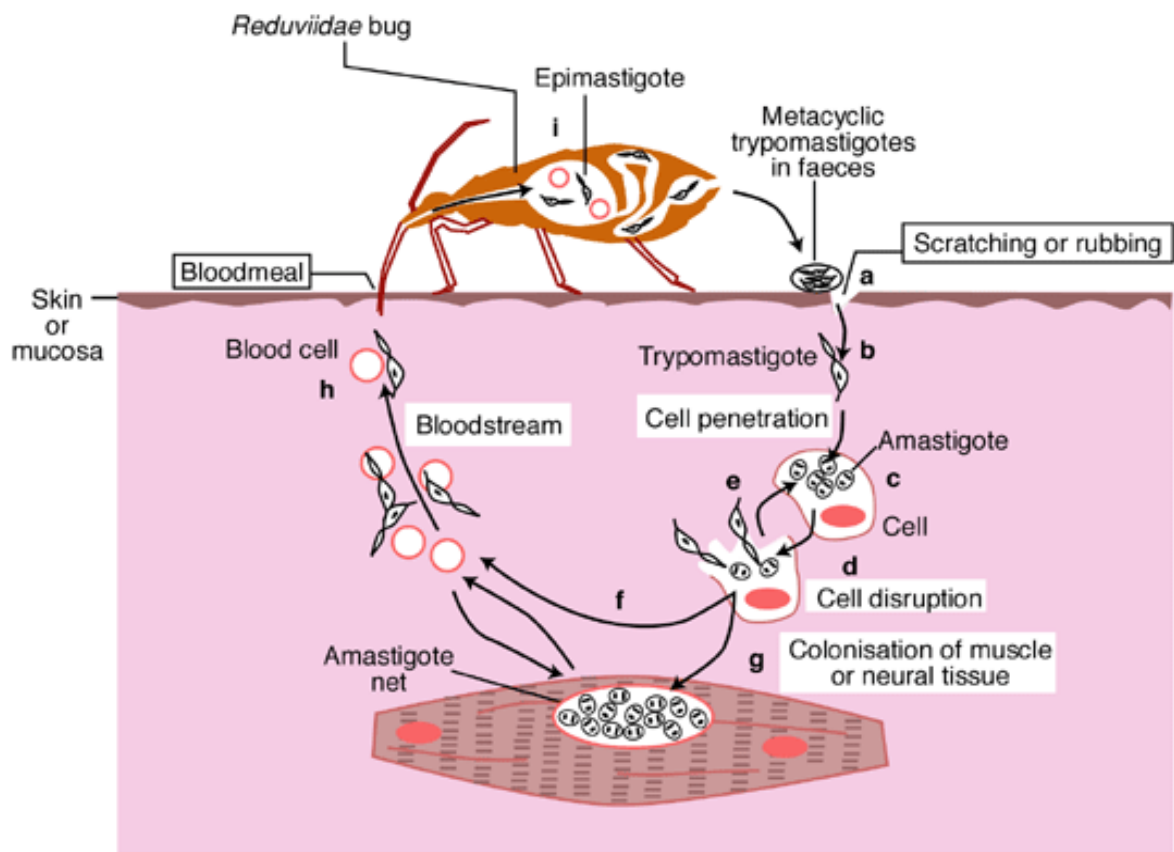


Figura 1.1. Ciclo do *T. cruzi* nos hospedeiros invertebrados e vertebrados com suas respectivas formas de parasitismo. (Cambridge University Press, 2002).

1.4.1. O DNA do cinetoplasto (kDNA)

O DNA do cinetoplasto (kDNA), encontrado nos protozoários da ordem Kinetoplastida, está localizado em uma região diferenciada da mitocôndria única desses organismos, denominada cinetoplasto. Na verdade, é uma estrutura altamente organizada que apresenta atividade para certas enzimas de cadeia respiratória e realiza a fosforilação oxidativa (Meyer, 1968; Simpson, 1973).

O kDNA representa cerca de 20% do DNA total da célula e está organizado em uma rede formada pela concatenação de milhares de moléculas de DNA circulares, que assemelha-se uma malha entrelaçada (Simpson & Berliner, 1974; Morel et al, 1980) e é constituída por dois tipos de moléculas circulares, os maxicírculos e os minicírculos.

Os maxicírculos são minoritários (5%) e contam, cada um, com cerca de 20 a 40 kb dependendo da espécie. São formados por sequências homogêneas, estão presentes de 20 a 50 cópias por rede e codificam os genes mitocondriais estruturais (De La Cruz et al, 1984; Shapiro & Englund, 1995). São homólogos funcionais do DNA mitocondrial de outros eucariotas e codificam RNAs ribossomais, alguns RNAs guias e proteínas envolvidas nos processos mitocondriais de geração de energia. Os minicírculos são moléculas menores, que constituem aproximadamente 95% do kDNA e se encontram na rede com cinco a dez mil cópias, na maioria das espécies de tripanossomatídeos. São heterogêneos em sequências e variam em tamanho de 0.5 kilobases (kb) a 2.5 kb entre as diferentes espécies de tripanossomatídeos, mas não são intraespecificamente constantes. O mecanismo de replicação envolve a ação de uma topoisomerase II, que libera os minicírculos da rede sob a forma de moléculas circulares covalentemente fechadas que se deslocam para a periferia da rede, onde se replicam e são novamente reincorporados à rede, que dobra de tamanho e segrega durante a divisão celular (Ryan et al, 1988; Shlomai, 1994). A função genética principal do minicírculo é a de codificar os pequenos RNAs guia que governam a especificidade da edição de RNA (Shapiro & Englund, 1995).

As regiões conservadas e variáveis variam em tamanho e em número de cópias e são encontradas nas moléculas de minicírculos. A sequência nucleotídica da região conservada é compartilhada intraespecificamente entre todos os minicírculos do kDNA enquanto a da região variável não é. A região conservada está relacionada à replicação dos minicírculos e possui um tamanho aproximado de 120 a 200 pares de bases (pb) e, quando presente em número maior do que um, apresenta disposição simétrica ao longo da molécula. Na região conservada há uma sequência dodecâmera (GGGGTTGGTGTA), também conhecida como Sequência Universal dos Minicírculos, presentes nos minicírculos de kDNA de todos os

tripanosomatídeos da ordem Kinetoplastida, representando a origem da replicação (Kidane et al, 1984; Ntambi & Englund, 1985; Ray, 1989; Morris et al, 2001).

Assim, através do sequenciamento de DNA de minicírculos de diferentes cepas e isolados de *T. cruzi*, foi demonstrado que cada molécula de aproximadamente 1.400 pares de bases (pb), encontra-se organizada em quatro pequenas regiões de 120 pb, dispostas em ângulos de 90°, as quais apresentam um alto nível de conservação de sequência intraespécie. Essas regiões conservadas apresentam-se intercaladas por outras quatro regiões maiores (regiões variáveis), com tamanho em torno de 330 pb, que exibem uma extrema variabilidade de sequência entre os milhares de minicírculos que compõem a rede de kDNA (Kidane et al, 1984).

A região variável apresenta uma heterogeneidade cuja origem é ainda obscura. A função codificante para RNAs guia fornece uma explicação para a heterogeneidade de sequência intra e entre espécies. Uma das vantagens adicionais é o grande número de cópias dessas moléculas por rede, o que facilita o diagnóstico através da PCR (Morel et al, 1980).

1.5. O diagnóstico molecular da infecção por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos vetores

Os alvos moleculares dos ensaios de PCR têm sido representados tanto pelo genomas mitocondrial como pelo nuclear do *T. cruzi* na detecção e tipagem de DNA parasitário em triatomíneos vetores (Breniere et al, 1992, 1995; Fernandes et al, 1998, Brisse et al, 2001; Brito et al, 2008). O kDNA é considerado como um alvo bastante eficaz para a detecção de DNA de *T. cruzi* através da PCR tanto em sangue (Britto et al, 1995) como em tecidos (Andrade et al, 2002) ou mesmo fezes de triatomíneos (Russomando et al, 1996, Brito et al, 2008) principalmente devido ao elevado número de cópias presente em cada parasito. Outra vantagem é que os minicírculos contêm quatro regiões de seqüências de DNA altamente conservadas e quatro variáveis presentes em todas as cepas e isolados representativos das

diferentes linhagens do *T. cruzi*, aumentando ainda mais a chance de amplificação do alvo desejado com grande margem de êxito. O ensaio de PCR para detecção de *T. cruzi* foi desenvolvido com oligonucleotídeos iniciadores que reconhecem sequências nucleotídicas conservadas nestes minicírculos, que podem gerar produtos de amplificação com tamanho molecular de 120 pb ("região conservada" do minicírculo) ou 330 pb ("região variável" do minicírculo) (Sturn et al ,1989). A amplificação da região intergênica do gene de mini-exon, de subunidades do DNA ribossomal (rDNA) (Fernandes et al ,1998, Souto et al, 1996, Zingales et al , 2009), e das regiões espaçadoras ITS-1 e ITS-2 do rDNA (Marcilla et al, 2001, Bargues et al, 2002; Pacheco et al, 2003, 2007) têm sido também aplicada com êxito na detecção e tipagem de *T. cruzi* em humanos e triatomíneos com contribuições não somente ao nível diagnóstico mas também taxonômico, filogenético e epidemiológico.

O ensaio molecular por PCR para detecção da presença de DNA de *T. cruzi*, além de mais sensível, tem se mostrado específico para este parasita. O método pode tornar-se ainda mais específico associando-se a hibridização molecular ao ensaio da PCR. Para esse fim, oligonucleotídeos específico capazes de discriminar os subgêneros *Schizotrypanum* e *Megatrypanum* de *Trypanosoma* foram desenhados (Pacheco et al 1996) Cabe ressaltar que outras espécies de protozoários flagelados, indistinguíveis de *T. cruzi* à microscopia óptica, podem estar presentes no conteúdo intestinal de triatomíneos, reduzindo assim a especificidade das técnicas parasitológicas tradicionais, neste caso a microscopia óptica (Silva et al 1977), o que reforça ainda mais a necessidade de aplicação de técnicas moleculares específicas, como a PCR, para o rastreamento da infecção natural em triatomíneos.

2. JUSTIFICATIVA

O índice de infecção natural por *T. cruzi* nos insetos vetores constitui uma importante informação para a avaliação do risco de transmissão vetorial da doença de Chagas em regiões nas quais há presença, nos ambientes domésticos e peridomésticos, de triatomíneos. Esta taxa de infecção costuma ser determinada pela microscopia óptica de suspensões do conteúdo intestinal dos insetos capturados em campo (nos ambientes silvestre, peridoméstico e doméstico), nos quais pesquisa-se a presença de tripanossomatídeos. Esta metodologia tem como principal desvantagem operacional a necessidade de se transportar os triatomíneos vivos até o laboratório, afim de que sejam examinados. Em estudos de campo, este transporte pode levar à perda de um percentual variável de espécimes, nos quais não será possível o diagnóstico. Espécimes silvestres do gênero *Rhodnius*, que dispõem de menos recursos alimentares em seus habitats naturais e frequentemente são coletados em jejum, apresentam usualmente as maiores taxas de mortalidade no transporte aéreo até o laboratório onde é pesquisada a infecção natural por *T. cruzi*. Soma-se a esta limitação o fato de que a análise por microscopia óptica, apesar de útil e facilmente aplicável no laboratório, não permite, como discutido acima, a identificação da espécie de tripanossomatídeo presente nas fezes dos triatomíneos.

Neste sentido, técnicas de biologia molecular baseadas na PCR têm sido desenvolvidas para a identificação de *T. cruzi* em amostras biológicas, como o conteúdo intestinal dos triatomíneos. Desta forma, a aplicação da PCR específica, associada ou não à hibridização molecular, permite detectar a presença de infecção por *T. cruzi* diretamente de material clínico (sangue e tecidos em humanos e outros mamíferos) e em fezes de triatomíneos (Brito et al , 2008) e sua identificação ao nível subgenérico (Pacheco et al, 1996), apresentando vantagens em relação aos métodos parasitológicos convencionais.

Nos municípios mais afetados pela doença de Chagas, é necessária a realização de inquéritos epidemiológicos e pesquisas entomológicas com coleta de amostras em campo. A presença de triatomíneos é pesquisada, buscando-se caracterizar a taxa de infestação domiciliar em distintas localidades, visando o planejamento das medidas de controle baseadas no combate ao vetor. Além do índice de infestação domiciliar, reveste-se de grande importância a estimativa da taxa de infecção por *T. cruzi* dos insetos coletados. Esta taxa é mais um parâmetro para a caracterização do risco local de transmissão vetorial da doença de Chagas. A detecção da infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos coletados em campo é também útil por permitir a realização de estudos em epidemiologia molecular e genética evolutiva deste protozoário, através de seu genoma.

No presente estudo, portanto, pretende-se avaliar, com triatomíneos coletados em campo, a aplicabilidade de uma técnica de coleta e transporte de seus conteúdos intestinais para diagnóstico da presença, nestes, do *T. cruzi*. A técnica, baseada na aplicação de suspensões fecais dos insetos em papel FTA Card, dispensa o transporte de insetos vivos para análise laboratorial e é capaz de preservar o material genético parasitário para estudos moleculares. O diagnóstico espécie-específico, através do ensaio da PCR, é então realizado diretamente no material aplicado ao papel de filtro.

A proposta do presente trabalho é utilizar fezes de triatomíneos aplicadas diretamente em papel de filtro (FTA Card), visando rastrear a infecção natural por *T. cruzi* em área endêmica no estado do Ceará. A sensibilidade da técnica de PCR para o diagnóstico molecular e sua concordância com a microscopia óptica, utilizando-se como alvo a região variável dos minicírculos do kDNA, serão avaliadas.

3 – OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade e a sensibilidade de uma técnica de diagnóstico molecular da infecção natural por *T. cruzi* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em três espécies de triatomíneos em área endêmica para doença de Chagas no município de Jaguaruana, estado do Ceará.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar as técnicas de microscopia óptica e PCR para o diagnóstico de infecção por *T. cruzi* em triatomíneos;
- Estimar a frequência de infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos coletados na área de estudo;
- Comparar as taxas de infecção por *T. cruzi* em diferentes espécies de vetores;
- Avaliar a aplicabilidade da criopreservação de amostras fecais de triatomíneos em papel de filtro para o diagnóstico molecular.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de coleta dos triatomíneos

O município de Jaguaruana está localizado na região leste do Estado do Ceará, distante aproximadamente 180 km de Fortaleza, a capital do estado, pertencente à região Nordeste do Brasil (Sarquis et al, 2004). A maioria dos triatomíneos estudados é proveniente de cinco áreas rurais deste município: Figueiredo (n = 33), Figueiredo Bruno (n = 5), João Duarte (n = 22), Córrego das Melancias (n = 16), Catinguinha (n = 30), Dió (n = 3), Perímetro Irrigado (n = 5) e Matinho (n = 1). Quatro espécimes foram coletados também em uma área rural no município de Russas, totalizando-se, portanto, 119 espécimes. Essas localidades constituem áreas de planícies de solos argiloso e arenoso, situadas no domínio da Caatinga, tipo de vegetação característica do semiárido brasileiro.

4.2. Captura de triatomíneos no ambientes intradomiciliar, peridomicíliar e silvestre

Uma equipe de pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz desenvolve, no Ceará, diversos trabalhos voltados para estudo da doença de Chagas. Os espécimes de triatomíneos estudados neste trabalho foram coletados, nos anos de 2000 e 2010, pelo Laboratório de Eco-Epidemiologia da Doença de Chagas do Instituto Oswaldo Cruz, da Fiocruz. Sessenta e oito triatomíneos foram capturados no ano de 2000 em ecótopos silvestres, domésticos e peridomésticos e outros 51 no período de novembro a dezembro de 2010 nas regiões intra e peri-domicílio (currais de ovelhas, chiqueiros, galinheiros, poleiros, pilhas de lenha e pedras). A coleta procedeu-se conforme descrito por Sarquis et al (2004), após a identificação individual das espécies foram realizadas a determinação dos estágios de desenvolvimento e do sexo nos espécimes adultos. Posteriormente, foram coletadas as fezes para identificação da infecção natural por *T. cruzi*.

Para as capturas foram utilizadas pinças manuais, procurando-se os insetos por busca ativa. Nos domicílios, as capturas foram efetuadas em todos os cômodos, vistoriando-se toda a superfície das paredes, dos pisos, dos móveis e de objetos que pudessem abrigar os triatomíneos.

Nos peridomicílios, incluíram-se anexos temporários, cercas, currais, chiqueiros, galinheiros, além de pedras, troncos e tijolos dispersos nas proximidades das residências. Os triatomíneos presentes nas superfícies das estruturas eram capturados também por meio de pinças manuais. Quando havia materiais empilhados como gravetos, pedras, telhas entre outros, as pilhas eram desfeitas para busca de novos insetos que ficavam abrigados. Novamente estes foram identificados e catalogados como aqueles coletados no intradomicílio.

4.3. Processamento inicial de amostras fecais de triatomíneos

Os triatomíneos foram enviados ao Laboratório em condições de biossegurança, acondicionados em recipientes plásticos, identificados com o local da coleta, a data e as características do inseto. Após a confirmação da identificação macroscópica das espécies, do estágio evolutivo e do sexo, os insetos foram processados com o auxílio de pinças, pressionando-se o abdome e induzindo a saída do conteúdo intestinal, que foram coletadas sobre lâminas de microscopia. As fezes foram diluídas sobre as lâminas, em solução salina tamponada (pH 7,0), cobertas com lamínulas e examinadas ao microscópio óptico com aumento de 400 vezes, para observação direta da infecção por tripanossomatídeos.

Alíquotas das suspensões fecais preparadas para visualização direta foram separadas e aplicadas em tiras de papel de filtro (FTA Card, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), que foram armazenadas individualmente em tubos de 2 mL e acondicionadas em freezer a -20 °C, para utilização na técnica de PCR.

Os papéis de filtro contendo as suspensões fecais individualmente dentro de cada tubo, foram retirados e picotados em pequenas partes medindo aproximadamente 1 milímetro, sobre placas de Petri estéreis, utilizando-se lâminas de bisturi também estéreis. Após picotados, os fragmentos de papel foram colocados em novos tubos estéreis e realizada a extração e purificação do kDNA das fezes dos triatomíneos. Para isto, removeu-se uma pequena porção da amostra picotada de papel FTA Card (aproximadamente 24 mm²), que foi colocada em tubos de microcentrífuga. De acordo com o manual do fabricante e adaptações neste protocolo descritas por Silva et al (2004) e Oliveira et al (2005), foram adicionados 200 µL de reagente FTA *Purification* em cada tubo e processou-se o material em vórtex por 20 segundos. Após 5 minutos, removeu-se o sobrenadante e a operação foi repetida por duas vezes. Após o descarte do sobrenadante, acrescentou-se 200 µL de tampão TE 1X (0,01M Tris,0,1mM EDTA, pH 8,0), e agitou-se em vórtex por 20 segundos e, após 5 minutos, novamente removeu-se o sobrenadante. A operação foi repetida com 200 µL de tampão TE mais uma vez. Após o novo descarte do sobrenadante, o material foi centrifugado e estocado em aproximadamente 50 µL de tampão TE em freezer a -20 °C.

4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico da infecção natural por *T. cruzi* no conteúdo intestinal dos triatomíneos.

A técnica de PCR foi utilizada para detecção de kDNA de *T. cruzi* a partir do DNA extraído do conteúdo intestinal dos triatomíneos estudados. De acordo com Wincker et al (1994) e Britto et al (1995) empregaram-se os iniciadores S35 5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3', e S36 5'-GGTTGCATTGGGTTGGTGTAATATA-3', que amplificam o fragmento de 330 pares de bases contendo regiões variáveis dos minicírculos do kDNA do parasita. O protocolo de reação foi realizado conforme descrito por Brito et al (2008) e a amplificação do kDNA

realizada em termociclador automático (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems). A mistura da reação continha 0,2mM de dNTP, 1,5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, 2,5 UI de Taq Polimerase e 5 pmol/μL de cada iniciador além de 3 μL da suspensão de kDNA obtida pelo papel de filtro, totalizando volume de 50 μL. A reação envolveu uma etapa inicial com temperatura de 94°C por 6 minutos seguidos de 33 ciclos de desnaturação do DNA (94°C por 1 minuto), anelamento (64°C por 1 minuto), e alongamento da cadeia (72°C por 1 minuto), sendo finalizado com um ciclo de 72°C por 7 minutos. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,8%, contendo o controle positivo do kDNA de *T. cruzi* cepa *Cl-Brener* e o controle negativo.

O cálculo comparativo das sensibilidades das técnicas diagnósticas (microscopia óptica e PCR) foi realizado da seguinte forma: sensibilidade da técnica = número de exames positivos por esta técnica / número de exames positivos em quaisquer das duas técnicas (Brenière et al. 1995).

4.5. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,8% em TBE 1X (0,89 M Trizma-Base, 0,89 M Ácido Bórico e 0,24 M EDTA Na₂, pH8.3) sendo a corrida processada à 80V por 2 horas. Foi utilizado o marcador de 100bp – 100 Base-Pair DNA Ladder (GE Healthcare). Foram aplicados no gel uma alíquota de 10μl dos produtos amplificados com 1μl da solução corante (0,02 gr azul de bromofenol, 0,02 gr xilenocianol, 2,5 gr ficoll 400, 10ml TBE 5X). Após a eletroforese o gel foi corado em brometo de etídio (0,5 μg/ml) visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta (UV) e fotografado em sistema de fotodocumentação (EasyDoc 100 BioAgency).

5 – RESULTADOS

A distribuição por espécie e por localidade de captura dos triatomíneos cujos conteúdos intestinais foram estudados está apresentada na **Figura 5.1**. A distribuição dos estágios de desenvolvimento e do sexo das três espécies de triatomíneos é apresentada na **Figura 5.2**. A positividade ao exame de microscopia óptica do conteúdo intestinal é apresentada na **Figura 5.3**.

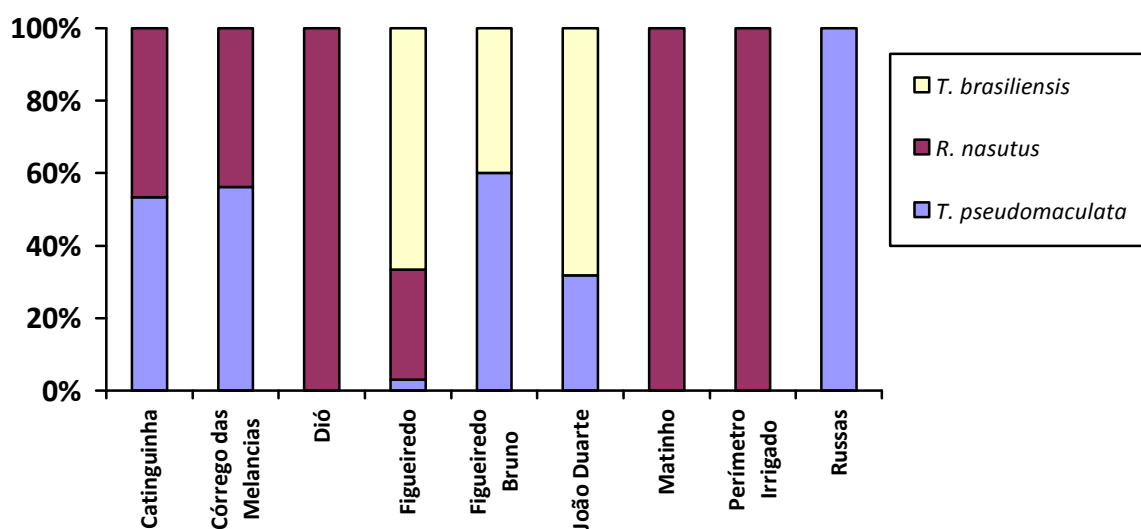


Figura 5.1. Distribuição das espécies de triatomíneos coletados, de acordo com as nove localidades do município de Jaguaruana e em Russas, Ceará, durante todo o período estudado.

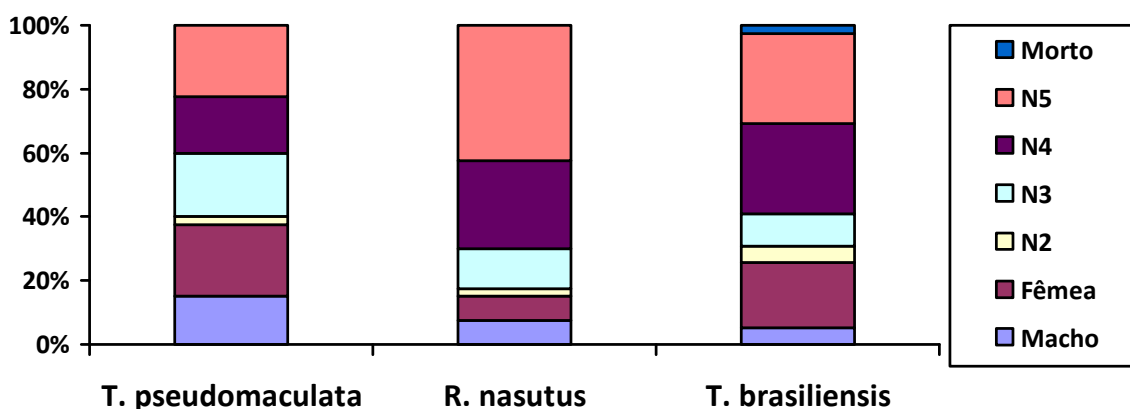


Figura 5.2 Distribuição dos triatomíneos de acordo com os estágios e sexo das três espécies durante todo o período estudado.

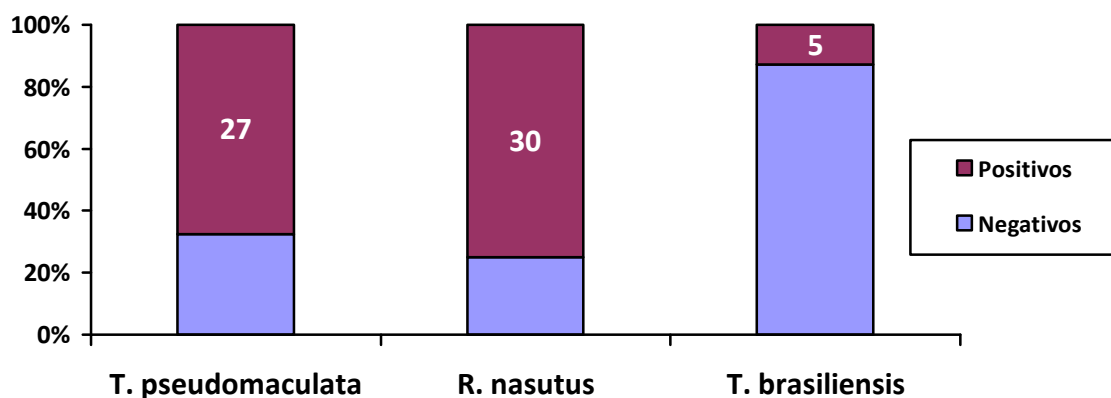


Figura 5.3. Distribuição por espécie dos triatomíneos naturalmente infectados pelo *T. cruzi*, analisados por exame direto de suspensões do conteúdo intestinal através de microscopia óptica, durante todo o período estudado.

Na análise individual do material fecal, de cada espécie, pela PCR específica, foram encontrados 35/40 (87,5%) *T. pseudomaculata* (**Figura 5.4**) naturalmente infectados pelo *T. cruzi*; 28/40 (70%) *R. nasutus* (**Figura 5.5**) naturalmente infectados; e 7/39 (17,9%) de *T. brasiliensis* (**Figura 5.6**) naturalmente infectados. Pelo exame direto do conteúdo intestinal por microscopia óptica, dos 119 triatomíneos utilizados no estudo, 62 (52,1%) foram positivos para infecção por tripanossomatídeos flagelados, enquanto outros 57 (47,9%) foram negativos. Com relação à análise dos 68 conteúdos intestinais criopreservados em papel FTA Card durante 10 anos, 58 eram positivos, à época da coleta, no ano 2000, pela microscopia óptica. Destes, 56 foram positivos também pela PCR realizada em 2011. Obteve-se, desta forma, uma sensibilidade comparativa de 96,5% para a PCR e 100% para a microscopia óptica. A concordância entre as técnicas foi de 66/68 (97%) para as amostras criopreservadas durante 10 anos. Estes dados estão sumarizados na **Tabela 5.1**.

Como demonstrado na **Tabela 5.2**, analisando-se as 51 amostras fecais frescas obtidas de triatomíneos recém-capturados, obteve-se uma positividade, pela microscopia óptica, de apenas quatro amostras e, pela PCR, de 14 amostras, obtendo-se uma sensibilidade de 100%

para a PCR e de apenas 28.6% para a microscopia óptica. A concordância entre as técnicas foi de 41/51 (80,4%) para as amostras recém-obtidas de insetos.

Analisando-se os dois grupos de amostras em conjunto, obtivemos uma concordância de 107/119 (89,9%) entre as técnicas.

No grupo de 51 triatomíneos recém-capturados, a proporção de insetos infectados foi significativamente superior entre aqueles pertencentes à espécie *T. pseudomaculata* (10/15; 66,7%), quando comparada àquela observada em *T. brasiliensis* (4/36; 11,1%), $p < 0,001$.

Tabela 5.1. Sensibilidade e concordância das técnicas de microscopia óptica e PCR para diagnóstico da infecção por *T. cruzi* no conteúdo intestinal de triatomíneos capturados no município de Jaguaruana e Russas, estado do Ceará no ano de 2000. As amostras foram criopreservadas e a análise por PCR realizada no ano de 2011. MO = microscopia óptica.

	Positivas na PCR		Negativas na PCR		Sensibilidade PCR	Sensibilidade MO	Concordância
	MO	MO	MO	MO			
	+	-	+	-			
Triatomíneos capturados em 2000	56	0	2	10	96,5%	100%	97%
TOTAL Triatomíneos	68						

Tabela 5.2. Sensibilidade e concordância das técnicas de microscopia óptica e PCR para diagnóstico da infecção por *T. cruzi* no conteúdo intestinal de triatomíneos capturados no município de Jaguaruana e Russas, estado do Ceará no ano de 2010. MO = microscopia óptica.

	Positivas na PCR		Negativas na PCR		Sensibilidade PCR	Sensibilidade MO	Concordância
	MO	MO	MO	MO			
	+	-	+	-			
Triatomíneos capturados em 2010	4	10	0	37	100%	28,6%	80,4%
TOTAL Triatomíneos	51						

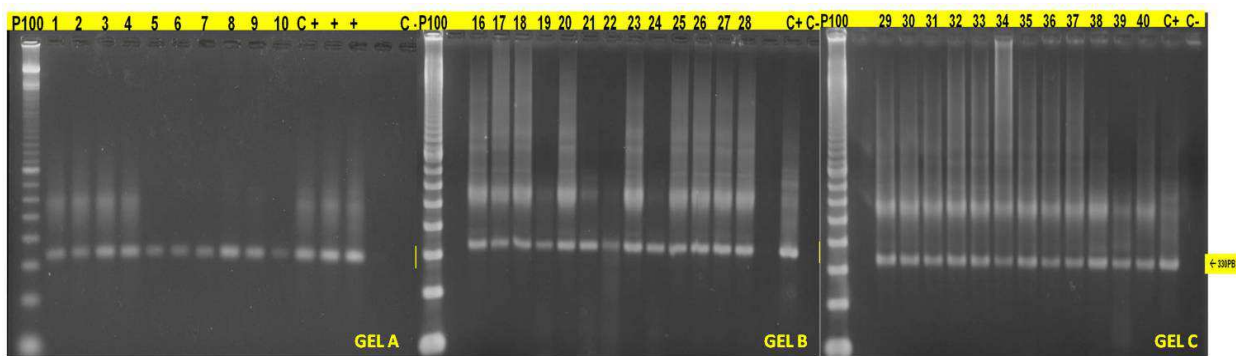


Figura 5.4. Gel de Agarose 1,8% mostrando as bandas diagnósticas de 330 pb após amplificação pela PCR de amostras fecais de *T. pseudomaculata* positivas para *T. cruzi*. (A, B e C), Marcador – 100 Base-Pair DNA Ladder (Ge Healthcare), C+ (controle positivo- kDNA de *T. cruzi* cepa *Cl-Brener*) e C – (controle negativo)

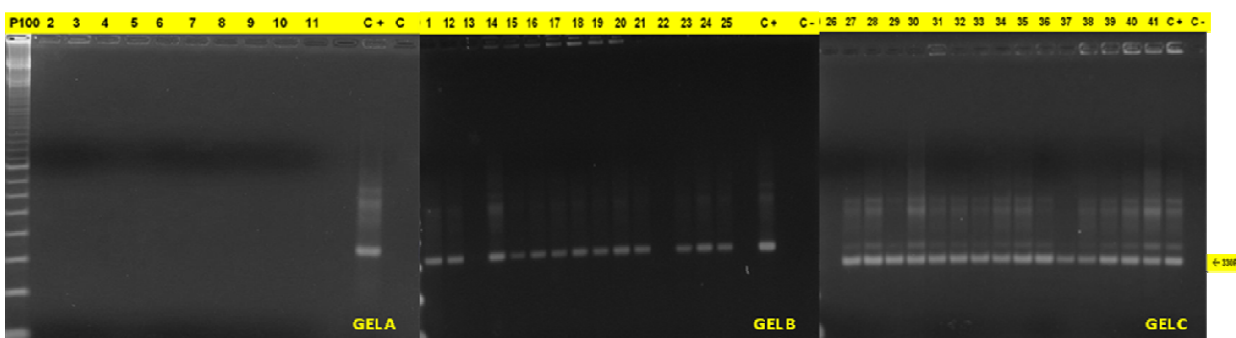


Figura 5.5. Gel de Agarose 1,8%, mostrando as bandas diagnósticas de 330 pb após amplificação pela PCR de amostras fecais de *R. nasutus* positivas para *T. cruzi* (B e C). Amostras negativas para *T. cruzi* (A). Marcador – 100 Base-Pair DNA Ladder (Ge Healthcare), C+ (controle positivo- kDNA de *T. cruzi* cepa *Cl-Brener*) e C – (controle negativo).

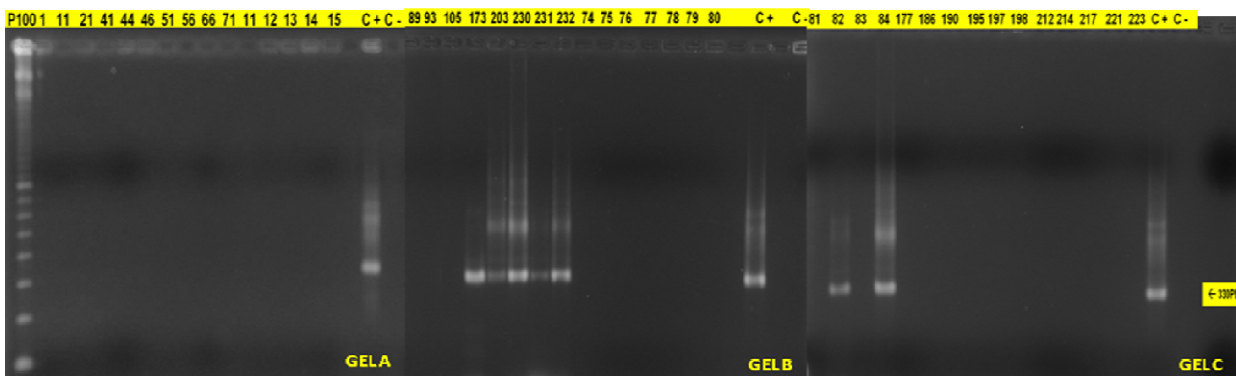


Figura 5.6. Gel de Agarose 1,8% mostrando a presença de algumas bandas diagnósticas de 330 pb após amplificação pela PCR de amostras fecais de *T. brasiliensis* positivas para *T. cruzi*. (B e C), Amostras negativas para *T. cruzi* (A). Marcador – 100 Base-Pair DNA Ladder (Ge Healthcare), C+ (controle positivo- kDNA de *T. cruzi* cepa *Cl-Brener*) e C – (controle negativo).

6 – DISCUSSÃO

Neste trabalho, realizamos uma análise comparativa de duas técnicas para diagnóstico da infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos coletados em campo. Foi confrontada a técnica de exame direto das suspensões fecais por microscopia óptica com a amplificação do genoma parasitário por PCR. De um modo geral, houve uma boa concordância entre as técnicas; os resultados foram congruentes em 107 de 119 amostras (89,9%). Podemos, a partir destes dados, sugerir que a PCR pode ser aplicada em inquéritos epidemiológicos de campo para estimativa das taxas de infecção natural por *T. cruzi* em distintas espécies de vetores coletadas em diferentes ecótopos.

O trabalho testou a hipótese de que a aplicação de suspensões obtidas a partir do conteúdo intestinal dos triatomíneos em papel FTA Card pode ser útil em pesquisas de campo, sendo capaz de preservar o genoma parasitário para posterior aplicação de técnicas de biologia molecular, inicialmente com fins diagnósticos, mas também com o potencial para utilização em estudos de variabilidade genética dos parasitas. O DNA pôde ser facilmente recuperado do papel FAT Card, tanto em suspensões fecais preparadas com material fresco quanto em material aplicado há 10 anos e criopreservado a -20°C.

A utilização do papel FTA Card em pesquisas de campo pode facilitar operacionalmente, portanto, a obtenção, armazenamento, transporte e processamento inicial de amostras biológicas infectadas em que se pretende recuperar o DNA de patógenos específicos. Cabe ressaltar aqui que estudos epidemiológicos de campo são realizados, comumente, a grandes distâncias dos laboratórios onde serão realizadas as análises moleculares.

Com relação ao diagnóstico da infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos, especificamente, esta metodologia pode facilitar significativamente a estimativa das taxas de infecção, devido a reduzir as perdas de insetos durante o transporte. Ressaltamos que, para a

observação direta do parasita nas fezes dos triatomíneos é necessário que estes cheguem ainda vivos aos laboratórios. Morto o hospedeiro invertebrado, os parasitas também se tornarão inviáveis para o diagnóstico, que é realizado basicamente pela observação da movimentação ativa dos flagelados. A sensibilidade da microscopia óptica pode também sofrer influência da destreza do examinador em detectar o parasita na suspensão do conteúdo intestinal.

A análise comparativa das diferentes sensibilidades das técnicas revelou que, nas amostras criopreservadas em papel FTA Card, a concordância dos resultados nas amostras foi próxima de 100% (66/68). A sensibilidade da PCR foi ligeiramente inferior, talvez apontando para alguma degradação do DNA conservado no FTA Card ao longo do tempo, neste grupo de amostras de suspensões fecais.

Entretanto, observou-se que, em amostras recém-obtidas de triatomíneos coletados há cerca de duas semanas em trabalho de campo, um número maior de amostras inicialmente negativas pela microscopia óptica revelou-se positiva pelo PCR. Neste grupo de amostras, a sensibilidade do exame microscópico direto foi significativamente inferior. De um conjunto de 14 amostras positivas pela PCR, em apenas quatro foi possível visualizar flagelados à microscopia óptica. Especulamos que a perda de mobilidade (e possível morte) dos parasitas após o período decorrido entre a captura do inseto e o exame direto das suas fezes possa ser uma explicação para a não detecção dos tripanossomatídeos.

Aplicando o protocolo do FTA Card, pudemos observar que a recuperação de DNA das suspensões fecais é um processo rápido e prático, capaz de aperfeiçoar, portanto, estudos em epidemiologia molecular de amostras biológicas obtidas em trabalhos de campo.

Brenière et al (1995) aplicaram a amplificação da região variável dos minicírculos do kDNA de *T. cruzi* com o objetivo de diagnosticar a infecção natural em triatomíneos nativos da Bolívia, incluindo *T. infestans*, espécie para a qual houve concordância entre os resultados obtidos por microscopia óptica e por PCR. Interessantemente, para três outras espécies,

Rhodnius pictipes, *Eratyrus mucronatus* e *Triatoma sordida*, cujos conteúdos intestinais foram todos negativos ao exame microscópico direto, a PCR foi capaz de detectar a infecção natural por *T. cruzi*. Embora estes resultados sejam comparáveis àqueles por nós obtidos, não foi utilizada, nesta pesquisa, a aplicação de amostras em papel de filtro.

Russomando et al (1996) utilizou o diagnóstico molecular por PCR em fezes secas de *T. infestans* coletadas em papel de filtro, examinando insetos infectados artificialmente pela alimentação em macacos infectados e triatomíneos coletados em campo. Os autores sugerem que o diagnóstico da infecção por *T. cruzi* por PCR pode reduzir o tempo necessário para o exame de insetos utilizados em xenodiagnóstico. Os dados obtidos com os triatomíneos coletados em campo foram também similares aos nossos resultados em fezes recém-coletadas; os autores relatam uma positividade de 84% pela PCR e 26% pela microscopia óptica. Os dados corroboram a especulação de que a eficácia do exame direto por microscopia óptica pode ser reduzida com a diminuição da mobilidade dos parasitas. Os autores sugerem ainda a aplicação de papéis de filtro nas paredes de residências infestadas por triatomíneos com o objetivo de captar matéria fecal dos insetos para posterior diagnóstico molecular.

Dorn et al (1999) compararam as sensibilidades da PCR e da microscopia óptica para detecção de *T. cruzi* em diferentes sítios anatômicos dos principais vetores da doença de Chagas na Guatemala. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas sensibilidades das técnicas para as amostras de conteúdo do tubo digestivo dos insetos coletadas a diferença foi observada, sendo a PCR significativamente mais sensível, conforme demonstrado nos resultados obtidos a partir da análise de material recém-coletado no nosso estudo. Os autores enfatizam ainda a necessidade de se 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.

Marcet et al (2006) realizaram a amplificação genômica das regiões variáveis do kDNA de *T. cruzi* em lisados fecais (não aplicados a papel de filtro) obtidos de *T. infestans*, sendo 33 amostras positivas e 93 amostras negativas à microscopia. Os ensaios de PCR detectaram o kDNA do parasita em 91% das amostras positivas e em 7,5% das amostras negativas ao exame direto. Entretanto, a PCR não foi capaz de detectar a presença do parasita em duas amostras positivas obtidas de *T. guasayana* e em duas amostras também positivas de *T. garciabesi*.

Fezes secas de triatomíneos depositadas na parede de uma habitação na Bolívia foram analisadas através de PCR visando a detecção de kDNA de *T. cruzi* por Hamano et al (2001). Os autores obtiveram o material através da raspagem das fezes, que foram positivas para a presença do genoma mitocondrial parasitário. Ressaltamos que o exame parasitológico tradicional neste tipo de amostra fecal não seria possível.

A detecção da infecção por *T. cruzi* em fezes de *T. infestans* artificialmente infectados em camundongos e coletadas em papel de filtro foi realizada também por Braz et al (2008). Os autores relatam que o parasita é detectável, por esta técnica, quatro dias após o repasto sanguíneo em camundongos infectados e sugerem a avaliação da metodologia do papel de filtro em pesquisas de campo.

O uso do papel de filtro para recuperar o kDNA do *T. cruzi* oferece diversas vantagens, conforme Brito et al (2008) relataram, sobretudo pela simplicidade do método, além da capacidade de manutenção deste tipo de genoma por longos períodos de tempo. Estes autores realizaram estudo em que foram analisados *T. pseudomaculata* e *R. nasutus* (140 espécimes), sendo suas fezes analisadas pela microscopia óptica e em seguida, com auxílio de papel de filtro, o kDNA foi extraído para realização da PCR. Embora o objetivo da pesquisa não tenha sido comparar as técnicas, os autores sugerem a sua utilização devido à facilidade de execução e interpretação dos resultados. Estes mesmos autores (Brito et al, 2008)

utilizaram o material genético de *T. cruzi* obtido de amostras coletadas em papel de filtro para estudos de variabilidade genética dos isolados obtidos de diferentes espécies de vetores e diferentes ecótopos através de polimorfismos genéticos gerados pela reamplificação genômica dos produtos de 330 pb com primer único em condições de baixa stringência (LSSP-PCR, sigla em inglês para Low Stringency Single Primer – PCR). Dessa forma foi possível identificar que 13 distintos genótipos de *T. cruzi* I circulam entre *T. pseudomaculata* e *R. nasutus* coletados no peridomicílio e em ambientes naturais de localidades urbanas e periurbanas do município de Jaguaruana.

No presente estudo utilizando a PCR, 87,5% dos *T. pseudomaculata*, 70% dos *R. nasutus* e 17,9% dos *T. brasiliensis* capturados e testados estavam naturalmente infectados pelo *T. cruzi*. Segundo Assis et al (2007), *T. pseudomaculata* vem se adaptando a ecótopos artificiais, sendo facilmente capturado no peridomicílio, principalmente em galinheiros. No município de Jaguaruana, este triatomíneo tem sido encontrado tanto em ambientes peridomiciliares como intradomiciliares, podendo estabelecer colônias (Sarquis et al, 2006).

Palmeiras da espécie *Copernicia prunifera* são bastante abundantes na região onde foram capturados os exemplares de *Rhodnius nasutus* incluídos neste estudo. Estas palmeiras são uma importante característica da paisagem semiárida do bioma da Caatinga, no vale do Rio Jaguaribe, fornecendo recurso natural para a população humana local, a cera de carnaúba. As palmeiras desta espécie estão frequentemente situadas próximo às residências e representam o principal habitat natural da espécie *Rhodnius nasutus* (Lima & Sarquis, 2008, Dias et al, 2011). Espécimes de *R. nasutus*, entretanto, são frequentemente encontrados no interior de residências, demonstrando-se o potencial desta espécie em invadir o domicílio humano em busca de alimento. Colônias estabelecidas de *R. nasutus* já foram descritas em currais de animais domésticos, demonstrando que esta espécie também representa um importante elo de ligação entre os ciclos de transmissão silvestre e doméstico da doença de

Chagas (Sarquis et al, 2006). O comportamento alimentar de *R. nasutus* indicam que esta espécie pode ser considerada um potencial vetor do *T. cruzi*, já que tem um tempo de alimentação longo e frequentemente defeca durante o repasto sanguíneo (Oliveira et al, 2009). Em relação às outras espécies aqui avaliadas, tanto *T. brasiliensis* quanto *T. pseudomaculata* são considerados os principais vetores da doença de Chagas em zonas semiáridas do nordeste do Brasil, devido às suas características ecológicas, sua distribuição generalizada, seus altos níveis de infecção natural (Silveira & Vinhaes, 1999). Estes dados associados aos achados em estudos descritos anteriormente ratificam a importância destes vetores na cadeia epidemiológica de transmissão da doença de Chagas região de Jaguaruana. E, ao mesmo tempo, reforçam a necessidade de uma vigilância epidemiológica constante para prevenir a dispersão de cepas de *T. cruzi* em ambientes domésticos (Pacheco et al, 2005).

Finalmente os dados do presente estudo pretendem, também, contribuir para o desenvolvimento de metodologias alternativas, eficazes e práticas de coleta, transporte e conservação de amostras biológicas obtidas em pesquisa de campo, nas quais se busca a detecção de agentes infecciosos. A técnica de coleta de amostras em papel FTA Card tem, portanto, aplicação em levantamentos epidemiológicos para planejamento de ações em saúde pública e em pesquisas em genética evolutiva e epidemiologia molecular de patógenos.

7 – CONCLUSÕES

- O papel FTA Card é um instrumento prático e eficaz para coleta, transporte, conservação e processamento inicial de amostras biológicas nas quais se deseja realizar ensaios de PCR para detecção de *T. cruzi*.
- A PCR demonstrou sensibilidade superior à microscopia óptica para o diagnóstico da infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos recém-coletados em campo.
- É possível recuperar DNA de amostras biológicas criopreservadas em papel FTA Card e utilizá-lo para ensaios de PCR após 10 anos.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque AFR, Brito RS, Moraes NO 1942. Importante foco de mal de Chagas e leishmaniose visceral americana no Vale do Cariri (Estados do Ceará e Pernambuco). O Hospital 2: 61-9.

Alencar JE, Santos AR, Bezerra OF et al 1976. Distribuição geográfica dos principais vetores de endemias no estado do Ceará. I. Triatomíneos. Rev Soc Bras Med Trop 10: 261-84.

Andrade LO, Machado CRS, Chiari E et al 2002. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. Exp Parasitol 100: 269-275

Alencar JE 1987. História Natural da Doença de Chagas no Estado do Ceará, Imprensa Universidade da UFC, Fortaleza, 341p.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) 2008. Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. Informe Técnico (35). Brasília: ANVISA.

Argolo AM, Felix M, Pacheco RS et al 2008. Doença de chagas e seus principais vetores no Brasil. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio. Fundação Oswaldo Cruz/Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, 67pp.

Assis GF et al 2007. Domiciliation of *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa e Espínola 1964) in the Jequitinhonha valley, state of Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop 40:391–396.

Bargues MD, Marcilla A, Dujardin JP et al 2002. Triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi*: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 159-164

Borges-Pereira J et al 2008. Epidemiology of Chagas disease in four rural localities in Jaguaruana, State of Ceará: seroprevalence of infection, parasitemia and clinical characteristics. *Rev Soc Bras Med Trop* 41 (4): 345-351.

BRASIL 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas. Vigilância em saúde: doença de Chagas. Brasília, (Série A. Normas e Manuais Técnicos - Cadernos de Atenção Básica, n. 22).

BRASIL 2011. Portal da Saúde/SUS. Aspectos Epidemiológicos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454> Acessado em 04 de janeiro de 2012.

Braz LM et al 2008. Suitability of a rapid DNA isolation and amplification for detection of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* dry fecal spots collected on filter paper. *Parasite* 15(4):595-8.

Breniere SF, Bosseno MF, Revollo S et al 1992. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am J Trop Med Hyg* 46(3):335-41.

Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J et al 1995. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *Am J Trop Med Hyg* 53:179-84.

Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M 2001. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon gene further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. Int J Parasitol 31: 1218-1226.

Britto C, Cardoso MA, Ravel C et al 1995 P. *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from Northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradiative hybridization. Exper Parasit 81:462-71.

Brito CM, Lima MM, Sarquis O, et al 2008. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer–polymerase chain reaction. Parasitol Res 103:1111–1117.

Bustamante FM 1956. Distribuição geográfica dos transmissores da doença de Chagas no Brasil e sua relação com certos fatores climáticos. Epidemiologia e profilaxia da enfermidade. Rev Bras Malariol D Trop 9: 191-211.

Carbajal de La Fuente AL, Minoli SA, Lopes CM, et al 2007. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. Acta Trop 101:115-9.

Carvalho-Costa FA, dos Santos SM, Pires MQ et al 2010. Sylvatic and peridomestic populations of *Triatoma pseudomaculata* are not significantly structured by habitat, as revealed by two genetic markers. J Vector Ecol.:35 (2):295-300.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2006. Chagas disease after organ transplantation - Los Angeles, California . MMWR Morb Mortal Wkly Rep 28;55(29): 798-800.

Chagas, CRJ 1909. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Osw Cruz 1(2):159-218.

Corrêa RR & Espínola HN 1964. Descrição de *Triatoma pseudomaculata*, nova espécie de triatomíneo de Sobral, Ceará (Hemiptera: Reduviidae). Arq Hig Saúde Publica São Paulo 29: 115-27.

Costa J, Freitas-Sibajev, MG, Pacheco RS 1997. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma braziliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Osw Cruz 92: 459-464.

Costa J, Almeida JR, Brito CMM et al 1998. Ecotopes, natural infection and trofic sources of different color patterns of *Triatoma braziliensis*. Mem Inst Osw Cruz 93: 7-13.

Costa J. 2000. Distribuição e caracterização de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Cad Saúde Publica, 16 (2): 93-5.

Coura, J R & Dias JC 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Osw Cruz 104 (1): 31-40.

Coura JR & Viñas PA 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 24;465 (7301):S6-7.

Da Silva NN, Clausell DT, Nóbilis H et al 1968. Epidemic outbreak of Chagas disease probably due to oral contamination [in Portuguese]. Rev Inst Med Trop São Paulo:10:265-76.

De La Cruz VF, Neckelmann N, Simpson L 1984. Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. J Biol Chem. 259(24):15136-47.

Dias JCP & Dias RB 1979. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. Ci Cultura: 31 (supl):105-18.

Dias, JCP 1988. Controle de vetores da doença de Chagas no Brasil e riscos da reinvasão domiciliar por vetores secundários. Mem Inst Osw Cruz 83 (1): 387-91.

Dias JCP & Schofield CJ 1999. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. Mem Inst Osw Cruz 94 (1): 103-21.

Dias JC, Machado EM, Fernandes AL et al 2000. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. Cad Saúde Publica 16:13-34.

Dias JCP & Macedo VO 2005. Doença de Chagas. In: Coura JR (Organ.). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 557-93.

Dias JC 2006. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Rev Soc Bras Med Trop: 39:370-5.

Dias JC 2009. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. Mem Inst Osw Cruz 104 (1) 41-45.

Dias FB, Paula AS, Belisário CJ et al 2011. Influence of the palm tree species on the variability of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Infect Genet Evol in press.

Dias-Lima AG & Sherlock IA 2000. Sylvatic vectors invading houses and the risk of emergence of cases of Chagas disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. Mem Inst Osw Cruz: 95: 611-3.

Dorn PL et al 1999. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. Am J Trop Med Hyg.:60 (5):740-5.

Dorn PL et al 2001. Comparison of Polymerase Chain Reaction on Fresh Tissue Samples and Fecal Drops on Filter Paper for Detection of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Osw Cruz: 96(4): 503-5.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA et al 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal DNA sequences. Am J Trop Med Hyg 58: 807-811.

Ferreira MS, Lopes ER, Chapadeiro E et al. 2002. Doença de Chagas. In. Veronesi R, Focaccia R (eds) Tratado de Infectologia. 2nd ed, Editora Atheneu, São Paulo 1195-1233.

Freitas SP, Freitas AL, Prazeres SM et al 2004. Influence of anthropic habits in the dispersion of *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 through *Mimosa tenuiflora* (Willdenow) (Mimosaceae) in the State of Ceará, Brazil. Cad Saúde Publica 20:333-6.

Freitas SPC, Lorosa ES, Rodrigues DCS et al 2005. Fontes alimentares de *Triatoma pseudomaculata* no estado do Ceará, Brasil. Rev Saúde Publica 39: 27-32.

Forattini, OP et al 1979. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana: XIV - Persistência e potencial de domiciliação de populações triatomínicas silvestres em região de intensa atividade agropecuária. Rev Saúde Pública 13 (2): 123-46.

Forattini OP 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. Rev Saú Pub 14:265-99.

Guhl F, Pinto N, Aguilera G 2009. Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. Mem Inst Osw Cruz; 104 Suppl 1:71-5.

Hamano S, Horio M, Miura S et al 2001. Detection of kinetoplast DNA of *Trypanosoma cruzi* from dried feces of triatomine bugs by PCR. Parasitol Int. 50 (2):135-8.

Kidane GZ, Hughes D, Simpson L 1984. Sequence heterogeneity and anomalous electrophoretic mobility of kinetoplast minicircle DNA from *Leishmania tarentolae*. Gene 27(3):265-77.

Lent H & Wygodzinsky P 1979. Revision of the *Triatominae* (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bull Amer Mus Nat Hist, 163: 520.

Lima MM & Sarquis O 2008. Is *Rhodnius nasutus* (Hemiptera; Reduviidae) changing its habitat as a consequence of human activities? Parasitol Res 102: 797–800.

Lima MM, Sarquis O, Oliveira TG et al 2012. Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: Epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. Trans R Soc Trop Med Hyg.: 106(3):143-9.

Marcet PL et al 2006. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. Parasitology.132 (Pt 1): 57–65.

Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM 2001. The ITS 2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species and phylogenetic relationships in triatomine vectors of chagas disease. Mol Phylogen Evolution 18: 136-142

Meyer H 1968. The fine structure of the flagellum and kinetoplast-chondriome of *Trypanosoma (Schizofrypanum) cruzi* in tissue culture. J. Protozool 15 (3): 614-21.

Moncayo A & Silveira AC 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Osw Cruz 104 (1):17-30.

Moraes RG, Leite I, Goulart, EG 2008. Parasitologia e Micologia humana. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 608pp.

Morel C, Chiari E, Plessmann Camargo E et al 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci USA 77:6810- 4.

Morel CM & Lazdins J 2003. Chagas disease. Nature Reviews Microbiology 1. London: Nature Publishing Group,14-15.

Morris JC, Drew ME, Klingbeil MM et al 2001. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. Int J Parasitol. 1;31(5-6):453-8.

Ntambi JM & Englund PT 1985. A gap at a unique location in newly replicated kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma equiperdum*. J Biol Chem 10;260(9):5574-9.

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ et al 2005. PCR based diagnosis for detection of Leishmania in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol 129:219–27.

Oliveira TG, Carvalho-Costa FA, Sarquis O et al 2009. Feeding and defecation patterns of *Rhodnius nasutus* (Hemiptera; Reduviidae), a triatomine native to an area endemic for Chagas Disease in the State of Ceará, Brazil. Am J Trop Med Hyg 81:651-5.

- Pacheco RS Thomaz N, Brandão AA et al 1996. Synthetic oligonucleotide that discriminates between the subgenera *Schizotrypanum* and *Megatrypanum*. *Parasite* 3: 297-299.
- Pacheco RS, Almeida CE, Costa J et al 2003. RAPD analyses and rDNA intergenic spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae, Triatominae). *Ann. Trop. Med. Parasitol* 97 : 757-768.
- Pacheco RS, Brito CMM, Sarquis O et al 2005. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine vectors in northeastern Brasil: Epidemiological Implications. *Biochem Genetics* 43: 519- 530
- Pacheco RS, Almeida CE, Klisiowicz DR et al 2007. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. *Parasite* 14: 231-237.
- PAHO (Panamerican of Health Organization) 1995. Iniciativa del Cono Sur. IV Reunión de la Comisión Intergubernamental para la Eliminación del *Triatoma infestans* y la interrupción de la tripanosomiasis americana transfusional. Asunción 50.
- Pinto AYC, Valente SAS, Valente VC 2004. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. *Braz J Infect Dis* 8: 454-60.
- Prata A, Dias JCP, Coura JR 2011. Os primórdios da doença. *Rev Soc Bras Med Trop* 44 (2): 6-11.
- Ray DS 1989. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. *Mol Cell Biol.* 9(3):1365-7.
- Rey, L 2008. *Parasitologia*. 4ªed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 884pp.

Russomando G, Arias AR, Almiron M et al 1996. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. Exp Parasit 83:62–6.

Ryan KA et al 1988. Replication of kinetoplast DNA in trypanosomes.. Annu Rev Microbiol. 1988;42:339-58.

Sarquis OM, Borges-Pereira J, Mac Cord JR et al 2004. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brasil. I. Presence of triatomines and rates of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. Mem Inst Osw Cruz 99: 263-70.

Sarquis OM, Sposina R, Oliveira TG et al 2006. Aspects of peridomiliary ecotopes in rural areas of Northeastern Brazil associated to triatomine (*Hemiptera: Reduviidae*) infestation, vectors of Chagas disease. Mem Inst Osw Cruz 101: 143-7.

Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP 1999. The process of domestication in triatominae. Mem Inst Osw Cruz 94 (1): 375-8.

Shapiro TA & Englund PT 1985. The structure and replication of kinetoplast DNA. Annu Rev Microbiol. 49:117-43.

Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA et al 1991. Possible oral transmission of acute Chagas disease in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 33:351–57.

Shlomai J 1994. The assembly of kinetoplast DNA. Parasitol Today 10(9):341-6.

Silva ER, Pattoli, DB, Correa RR et al 1977. Observações sobre o encontro de tripanossomatídeos do gênero *Blastocrithidia*, infetando naturalmente triatomíneos em insetário e no campo. Rev Saúde Pública 11(1): 87-96.

- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS et al 2004. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genet Mol Res* 3:251–7.
- Silveira AC & Dias JCP 2011. O controle da transmissão vetorial. *Rev Soc Bras Med Trop* 44 (2): 52-63.
- Silveira AC, Feitosa VR, Borges R 1984. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83, Brasil. *Rev Bras Malariol D Trop* 36: 15-312.
- Silveira AC & Vinhaes MC 1999. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem Inst Osw Cruz* 94 (1): 405-11.
- Simpson L 1973. Structure and function of kinetoplast DNA. *J Protozool.* 20 (1): 2-8.
- Simpson L & Berliner J 1974. Isolation of the kinetoplast DNA of *Leishmania tarentolae* in the form of a network. *J Protozool.* 21(2):382-93.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo A et al 1996. DNA markers define two phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83: 141-152.
- Sturm N, Degraeve W, Morel C et al 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences. Use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 33: 205-214
- Tatto E, Menezes JA, Kitagawa BY et al 2007. Acute Chagas disease (ACD) outbreak related to sugar cane drunk in Santa Catarina State, south Brasil. In: Abstracts of the 56th Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2007 Nov 4–8; Philadelphia. Philadelphia: The Society; Abstract 997.

Vinhaes MC & Dias JC 2000. Doença de Chagas no Brasil. Cad Saúde Pública: 16 (2): S7-S12.

Wincker P, Britto C, Borges-Pereira J et al 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. Am J Med Trop Hyg 51:771-7.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR et al 2009. Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Osw Cruz 104:1051-4.