



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ELORA DAIANE DE MENEZES SILVA

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Rhodnius prolixus* E *Triatoma maculata* À INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi* APÓS SUBMISSÃO AO XENODIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS

Manaus – AM

2022

ELORA DAIANE DE MENEZES SILVA

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Rhodnius prolixus* E *Triatoma maculata* À INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi* APÓS SUBMISSÃO AO XENODIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito à obtenção da nota na disciplina TCC IV do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Vale Barbosa Guerra.

Co-orientador (a): Prof.^a Dr.^a Silvia Cassia Brandão Justiniano.

Manaus- AM

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

S586aa Silva , Elora Daiane de Menezes

Avaliação da susceptibilidade de *Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata* à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* após submissão ao Xenodiagnóstico de pacientes com Doença de Chagas / Elora Daiane de Menezes Silva . Manaus : [s.n], 2022.
27 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.

Inclui bibliografia

Orientador: Maria Das Graças Vale Barbosa Guerra

Coorientador: Silvia Cassia Brandão Justiniano

1. Doença de Chagas . 2. Xenodiagnóstico. 3. Susceptibilidade. 4. Vetores . 5. Triatomíneos . I. Maria Das Graças Vale Barbosa Guerra (Orient.). II. Silvia Cassia Brandão Justiniano (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Avaliação da susceptibilidade de *Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata* à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* após submissão ao Xenodiagnóstico de pacientes com Doença de Chagas

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu a vida e infinitas possibilidades;

À minha mãe Deusimar Menezes e ao meu pai João Batista, os meus primeiros professores;

À minhas orientadoras Dra. Graça Barbosa e Dra. Silvia Justiniano, pelos ensinamentos e oportunidades;

Ao Grupo de Pesquisa em Doença de Chagas e Leishmaniose Dr. João Macias Frade;

À Fundação de Medicina Tropical- Doutor Heitor Vieira Dourado e aos pacientes desta instituição.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Tripanossomíase americana, mais conhecida como doença de Chagas, em homenagem ao seu descobridor o médico Carlos Chagas, está entre as cinco endemias mais importantes da América Latina. Essa enfermidade é causada pelo protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi* e tradicionalmente transmitida ao homem, por meio das fezes contaminadas de insetos vetores pertencentes à subfamília Triatominae, conhecidos como barbeiros. O Xenodiagnóstico é um método usado como exame parasitológico complementar no diagnóstico dessa doença. No procedimento se usa triatomíneos como meio biológico de cultura para a detecção da infecção pelo *T. cruzi*. Estudos sugerem que a xenopositividade possa estar associada com a maior ou menos susceptibilidade da espécie de triatomíneos. **OBJETIVO:** Avaliar a susceptibilidade de duas espécies de triatomíneos (*Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata*) à infecção pelo *T. cruzi* usadas durante o xenodiagnóstico de portadores da doença de Chagas. **MÉTODOS:** Foram acompanhados dois grupos de 20 ninfas de 3ª instância, das espécies, criadas em laboratório, usadas no xenodiagnóstico de 16 portadores da doença de Chagas. As ninfas foram pesadas antes e após o repasto sanguíneo e as fezes observadas em lâminas, através do exame a fresco, em leituras, realizadas em intervalos de 15, 60, 90, 180 dias pós o xenodiagnóstico. **RESULTADOS:** Foi observado que *Rh. prolixus* ingeriu maior quantidade de sangue, (média de 0,199g) do que *T. maculata* (0,143), com uma diferença de 0,056. A média do peso *Rh. prolixus* antes do repasto foi de 0,033g e após foi de 0,232g enquanto *T. maculata* antes foi de 0,068g e após foi 0,211g. Não houve positividade para infecção por *T. cruzi* nas duas espécies após as análises de 496 lâminas nos quatro intervalos de tempo estabelecidos. **CONCLUSÃO:** Pelo método de exame direto a fresco não foi observado a presença de infecção por *T. cruzi* nas espécies observadas durante 180 dias após o xenodiagnóstico. Observa-se, no entanto, que *Rh. prolixus* ingeriu maior quantidade de sangue do que *T. maculata*, o que indica a necessidade de investigação de infecção por metodologias mais sensíveis antes de inferir ausência de parasitemia em portadores ou que as espécies não são susceptíveis a infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Xenodiagnóstico, Susceptibilidade.

ABSTRACT

INTRODUCTION: American trypanosomiasis, better known as Chagas disease, in honor of its discoverer, physician Carlos Chagas, is among the five most important endemic diseases in Latin America. This disease is caused by the flagellate protozoan, *Trypanosoma cruzi*, and is traditionally transmitted to humans through the contaminated feces of vector insects belonging to the subfamily Triatominae, known as barbeiros. Xenodiagnosis is a method used as a parasitological examination to complement the diagnosis of this disease. The procedure uses triatomines as a biological culture medium for the detection of *T. cruzi* infection. Studies suggest that xenopositivity may be associated with greater or lesser susceptibility of the triatomine species. **OBJECTIVE:** To evaluate the susceptibility of two species of triatomines (*Rhodnius prolixus* and *Triatoma maculata*) to *T. cruzi* infection used during the xenodiagnosis of patients with Chagas' disease. **METHODS:** Two groups of 20 nymphs of the 3rd stage of the species, created in the laboratory, used in the xenodiagnosis of 16 carriers of Chagas' disease were followed up. The nymphs were weighed before and after the blood meal and the feces were observed on slides, through the fresh examination, in readings, performed at intervals of 15, 60, 90, 180 days after the xenodiagnosis. **RESULTS:** It was observed that *Rh. prolixus* ingested a greater amount of blood (mean of 0.199g) than *T. maculata* (0.143), with a difference of 0.056. The average Rh weight. *prolixus* before the meal was 0.033g and after it was 0.232g while *T. maculata* before it was 0.068g and after it was 0.211g. There was no positivity for *T. cruzi* infection in the two species after the analysis of 496 slides in the four established time intervals. **CONCLUSION:** The presence of infection by *T. cruzi* in the species observed during 180 days after xenodiagnosis was not observed using the direct fresh examination method. It is observed, however, that *Rh. prolixus* ingested a greater amount of blood than *T. maculata*, which indicates the need for investigation of infection by more sensitive methodologies before inferring the absence of parasitemia in carriers or that the species is not susceptible to infection by *Trypanosoma cruzi*.

Keywords: Chagas disease, Xenodiagnosis, Susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

	pág.
FIGURA 1- Imagem de um exemplar adulto de <i>Rhodnius prolixus</i> Stal, 1859	13
FIGURA 2- Imagem de um exemplar adulto de <i>Triatoma maculata</i> (Erickson, 1848)	13
FIGURA 3 - Peso de <i>Triatoma maculata</i> e <i>Rhodnius prolixus</i> antes e após o repasto sanguíneo	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>Doença de Chagas</i>	9
1.2 <i>Aspectos epidemiológicos</i>	9
1.3 <i>Transmissão</i>	10
1.4 <i>Manifestação clínica</i>	11
1.5 <i>Diagnóstico</i>	11
1.5.1 <i>Diagnóstico da DC na fase aguda</i>	11
1.5.2 <i>Diagnóstico na fase crônica</i>	12
1.5.3 <i>Xenodiagnóstico</i>	12
1.6 <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.7 <i>Ciclo de vida biológico do Trypanosoma cruzi</i>	13
1.8 <i>Triatomíneos vetores</i>	14
1.9 <i>Ciclo de vida biológico dos Triatomíneos</i>	15
1.10 <i>Doença de Chagas na Amazônia</i>	16
1.11 <i>FMT- HVD</i>	16
1.11.1 <i>Centro de Entomologia médica</i>	17
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 <i>Geral</i>	18
3.2 <i>Específicos</i>	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 <i>Caracterização da Área de estudo</i>	18
4.2 <i>Caracterização do tipo de estudo</i>	18
4.3 <i>Procedimentos</i>	19
4.4 <i>Coleta e Análises de dados</i>	20
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÃO	23
8. REFERENCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A Tripanosomíase americana, mais conhecida como doença de Chagas, em homenagem ao médico e pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1897-1934), que a descreveu pela primeira vez a mais de 100 anos (CHAGAS, 1909), é originária do continente americano, está entre as cinco mais importantes endemias da América Latina (OMS, 2019).

É caracterizada como uma antropozoonose por ser causada pelo protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, que realiza primariamente um ciclo biológico silvestre em mais de 100 espécies de mamíferos (COURA, 2009) podendo ser transmitida ao homem por meio das fezes contaminadas de insetos vetores pertencentes à subfamília Triatominae. O ciclo da antropozoonose teve início com a domiciliação dos triatomíneos vetores em consequência do desmatamento e construção de habitações próximas a florestas, o que permitiu a circulação do *T. cruzi* não somente entre animais silvestres, mas também entre animais domésticos e o homem (COURA, 2015) dentre os animais silvestres mais relevantes estão os tatus, gambas, primatas não humanos, morcegos, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

1.2 Aspectos epidemiológicos

Essa enfermidade possui uma ampla distribuição no continente Americano, ocorrendo predominantemente em áreas rurais e em desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima que aproximadamente 120 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença, e que aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo. No Brasil são estimados 1,15 milhões de indivíduos chagásicos e 25 milhões de pessoa moram em área de risco de infecção (WHO, 2015). a maior prevalência da DC foi relatada na Bolívia (6,75-15,4%), Paraguai (0,69-9,3%) e Panamá (0,01-9,02%), e o número total de casos no Brasil (0,8-1,30%), México (0,5-6,8%) e Argentina (4,13-8,2%), juntos, respondem por quase 60% de todas as pessoas infectadas com pelo *T. cruzi* na América Latina (STRASEN, 2014).

Com o objetivo de interromper a transmissão da infecção pela eliminação dos insetos vetores domésticos, foram realizadas varias iniciativas multinacionais

coordenadas pela Organização Pan-Americana de Saúde. Os governos dos seis países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) lançaram em 1991 uma ambiciosa iniciativa para controlar a doença de Chagas por meio da eliminação do vetor epidemiologicamente mais relevante, *Triatoma infestans*, e em larga escala triagem de doadores de sangue. O programa alcançou um sucesso notável, com a transmissão interrompida em vastas áreas das regiões anteriormente endêmicas. Bem mais de 2 milhões de casas rurais foram pulverizadas para eliminar o *T. infestans*, e o programa apresentou taxas de retorno econômico significativas, além dos benefícios médicos e sociais (SCHOFIELD, *et al.*, 2006).

Mesmo tendo sido reduzida a prevalência, incidência e mortalidade, a tripanossomíase americana ainda é uma doença tropical negligenciada de grande importância, permanecendo endêmica em 21 países das Américas, afetando aproximadamente 6 milhões de pessoas, com incidência anual de 30 mil casos novos na região, ocasionando em média, 14.000 mortes por ano e 8.000 recém-nascidos infectados durante a gestação. Estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas vivem em áreas de exposição e correm o risco de contrair a doença. (OMS, 2019).

1.3 Transmissão

Os mecanismos de transmissão da infecção chagásica podem ser divididos em dois grupos: O primeiro, por meio de triatomíneos vetores (transmissão vetorial clássica), transfusão sanguínea, transmissão oral (mais frequente entre os animais no ciclo silvestre) e transmissão placentário. O segundo grupo por acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplantes de órgãos e transmissão sexual (COURA, 2009; SHIKANAI-YASUDA, 2012).

A ocorrência da forma de transmissão clássica da doença (vetorial) depende de três fatores básicos: a presença do *T. cruzi*, a presença de triatomíneos domiciliados, a presença de hospedeiros humanos e outros animais vivendo no ambiente domiciliar. Esse tipo de transmissão ocorre em cerca de 80% das infecções e está diretamente relacionado a fatores humanos e sócios econômicos, tais como a qualidade da habitação, a ação do ser humano sobre o ambiente e as migrações humanas (MONCAYO, 1999; SHIKANAI-YASUDA, 2012).

A principal diferença clínica entre as descrições de área endêmica do passado e a Região Amazônica (transmissão predominante por via oral) é a apresentação clínica de elevada morbidade, ressaltando a característica epidemiológica regional no que se refere à ocorrência da transmissão muito mais eficaz que a via vetorial. (SHIKANAI-YASUDA, 2012).

1.4 Manifestação clínica

A doença de Chagas apresenta manifestações clínicas bifásicas, composta por uma fase aguda que geralmente é clinicamente inaparente e uma fase crônica, que por sua evolução com diferentes perfis de morbimortalidade nas formas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva, tem um grande impacto econômico principalmente por elevados gastos com tratamento, licença saúde e óbitos. Após a fase aguda, geralmente benigna e inaparente, segue-se uma fase clínica conhecida como “indeterminada” ou “inaparente”, na qual associam-se ausência de sintomatologia clínica com sorologia positiva. Após vinte a trinta anos, cerca de 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a fase crônica, sintomática, com diferentes formas clínicas: cardíaca, digestiva ou neurológica (MONCAYO, 1999; ARAÚJO-JORGE, 2000).

1.5 Diagnóstico

1.5.1 Diagnóstico da DC na fase aguda

O diagnóstico etiológico da doença de Chagas na fase aguda e na fase crônica é realizado pela detecção do parasito através de métodos parasitológicos (diretos ou indiretos) e pela presença de anticorpos no soro, através de testes sorológicos, sendo os mais utilizados a Imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Testes utilizando técnicas biomoleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são indicados quando os testes sorológicos apresentam resultado indeterminado ou após o tratamento antiparasitário. (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ; MULLER, 1990).

1.5.2 Diagnóstico na fase crônica

Na fase crônica da doença de Chagas, os métodos parasitológicos de enriquecimento/multiplicação, hemocultural e xenodiagnóstico (CERISOLA, 1974) apresentam comprovadamente baixa sensibilidade, o que implica a ausência de valor diagnóstico quando o resultado for negativo. Quando apresentam resultados positivos, possuem utilidade principalmente no controle do tratamento específico ou nos casos não usuais, quando a sorologia apresenta resultados inconclusivos. (LUQUETTI; RASSI, 2000).

1.5.3 Xenodiagnóstico

O Xenodiagnóstico é um procedimento em que o inseto vetor é utilizado como meio biológico de cultura para a detecção da infecção pelo *T. cruzi* em humanos e em outros mamíferos. Foi introduzido por Brumpt, em 1914, é um dos exames parasitológicos aplicados à forma crônica da doença de Chagas, e nas últimas décadas vem sendo adaptado e testado com variada espécie de triatomíneos vetores buscando-se a espécie mais adequada para este tipo de análise. É considerado como padrão no diagnóstico, principalmente, quando as provas sorológicas são inconclusivas em pacientes imunodeprimidos e no controle pós-terapêutico. (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ; MULLER, 1990).

Em experimentos sobre a importância do Xenodiagnóstico no estudo da DC, o XD indireto é o mais recomendável, de acordo com (DIAS, 1945). Ele descreveu a técnica do XD aplicada a DC, onde relata que a primeira condição para o emprego rigoroso do XD é a garantia da pureza dos insetos utilizados, estes deveriam vir de laboratórios de isentos de qualquer tipo de infecção por flagelados (CASTRO, 2000).

1.6 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae Kent, 1880. Na natureza pode ser encontrado em diferentes populações de hospedeiros

vertebrados tais como seres humanos, animais silvestres e animais domésticos e nos invertebrados (insetos vetores). O *T. cruzi* possui variações morfológicas e funcionais, alternando entre estágios que sofrem divisão binária e as formas não replicativas e infectantes. Como formas replicativas estão incluídas os epimastigotas presentes no tubo digestivo do inseto vetor e amastigotas observados no interior das células de mamíferos. As formas não replicativas e infectantes, os tripomastigotas metacíclicos, são encontrados nas fezes e urina do inseto vetor e os tripomastigotas circulantes no sangue de mamíferos (AZAMBUJA, P.; GARCIA, 2017).

1.7 Ciclo de vida biológico do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e inclui a infecção do hospedeiro vertebrado e a transmissão por insetos vetores, durante seu ciclo digenético ele passa por 4 estágios morfológicos: epimastigota e tripomastigota metacíclico no hospedeiro invertebrado, o inseto triatomíneo conhecido popularmente como barbeiro. Amastigota e tripomastigota sanguineo no hospedeiro mamífero, e essas fases diferem morfolologicamente pela disposição do flagelo e pela localização do cinetoplasto que é uma estrutura desses protozoários localizada em uma mitocôndria gigante com DNA próprio. A fase epimastigota se destaca pela sua multiplicação no intestino do vetor, apresenta um flagelo que parte do cinetoplasto. O tripanossomo metacíclico é a fase de diferenciação e localização do epimastigota na parte distal do intestino do vetor, é a forma infecciosa. Amastigota, a forma de replicação intracelular, é de forma arredondada na morfologia com um flagelo dentro do parasita. O tripomastigota é uma fase de diferenciação, ele infecta novas células e é ingerido pelo vetor transmissor no sangue do hospedeiro vertebrado (GONZÁLEZ, 2014).

Após a picada, o parasita é liberado junto com as fezes, na forma de tripomastigota metacíclica, e entra no hospedeiro por meio da lesão causada durante a picada do barbeiro ou através de mucosa. Uma vez na corrente sanguínea, as tripomastigotas são capazes de penetrar em uma ampla variedade de tipos de células. No interior das células, os parasitas se transformam em formas amastigotas, que passam por vários ciclos de divisão, multiplicando-se por fissão binária a cada 10 horas. Os amastigotas se diferenciam e se tornam tripomastigotas que são liberados pela lise celular, entram na corrente sanguínea e iniciam o próximo ciclo de infecção, pois

podem infectar outras células e se tornar amastigotas intracelulares (GONZÁLEZ, 2014).

1.8 Triatomíneos vetores

Os vetores da doença de Chagas são insetos hematófagos, amplamente distribuídos nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina, onde 150 espécies são conhecidas e considerados potenciais vetores da doença de Chagas. Entretanto, somente cerca de 20 espécies pertencentes aos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* têm sido capazes de colonizar habitações humanas (DIAS, 2001), e estão envolvidas na transmissão natural da infecção pelo *T. cruzi*, tanto intervindo diretamente em sua veiculação no ambiente domiciliar ou participando na manutenção da enzootia chagásica (CARCAVALLO, *et al.*, 1997).

São insetos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, e se caracterizam por reunir características morfológicas (rosto tri segmentados, retilíneos, diferente de hemípteros fitófagos e predadores) não presentes em outros reduvídeos, associadas ao hábito picador-sugador (LENT, 1979). A subfamília Triatominae é composta atualmente por 150 espécies e duas espécies fósseis, distribuídas em cinco tribos e 18 gêneros (GALVÃO, *et al.*, 2003)

Rhodnius prolixus Stal, 1859 é um dos vetores mais importantes para o *T. cruzi* devido a sua antropofilia, rápido ciclo de desenvolvimento, grande densidade, intensa dispersão passiva e alta susceptibilidade à infecção e transmissão do *T. cruzi*. É o principal vetor da Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela, de onde se acredita ter se disseminado para os países da América Central, com exceção do Panamá e da Costa Rica. Assim, esse vetor atinge países andinos, amazônicos e centro-americanos, *R. prolixus* é considerado um nativo da Colômbia e Venezuela, onde é o principal vetor de *T. cruzi*, ocorrendo originalmente em palmeiras, com adaptação a habitações humanas (COURA, 2015).

Triatoma maculata (Erickson, 1848) ocupa áreas no Brasil, nas Guianas, nas Antilhas Holandesas, no Suriname e na Venezuela. Na Venezuela, após *R. prolixus*, *T.*

maculata é o vetor doméstico mais importante. No Brasil, *T. maculata* foi encontrado em galinheiros em áreas peridomésticas e esporadicamente em residências no estado de Roraima, na Amazônia brasileira. Assim, esta espécie é um vetor potencial para *T. cruzi* (LUITGARDS-MOURA, *et al.*, 2005)



FIGURA 1- Imagem de um exemplar adulto de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859

Fonte: Acervo Pessoal



FIGURA 2- Imagem de um exemplar adulto de *Triatoma maculata* (Erickson, 1848) Fonte: Acervo pessoal

1.9 Ciclo de vida biológico dos Triatomíneos

Os triatomíneos possuem desenvolvimento hemimetábolo, ou seja, o ciclo de vida de ovo a adulto passa por cinco fases imaturas, são chamadas de ninfas que se assemelham aos adultos. Para seu desenvolvimento, tanto macho, quanto a fêmea

(imaturos e adultos), necessitam de sangue, fato este que os levou a estabelecer relações com os seus hospedeiros vertebrados, incluindo os seres humanos. Algumas espécies defecam durante ou após a alimentação e outras defecam, longe do local da sucção. Este comportamento pode classificar as diferentes espécies como “boas ou más” transmissoras da doença, uma vez que as formas infectantes de *T. cruzi* são expelidas nas fezes dos insetos infectados (LAZZARI, 2014).

1.10 Doença de Chagas na Amazônia

Nos últimos anos, tem sido registrado um número crescente de casos de doença de Chagas aguda na Amazônia com características sub-regionais particulares, onde o ciclo de transmissão ocorre em ambientes silvestres onde o *T. cruzi* circula entre vetores e reservatórios silvestres (BARBOSA, *et al.*, 2015).

De acordo com o Ministério da Saúde, entre 2005 a 2010, foram notificados mais de 1.000 casos agudos de doença de Chagas e destes 879 (87%) ocorreram nos estados que compõem a Amazônia Legal, e os estados brasileiros com o maior número de casos registrados foram: Pará, Amapá e Amazonas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Em 2020, foram confirmados 146 casos de DCA no Brasil, com uma letalidade de 2% (3/146). A região Norte apresentou a maior taxa de incidência da doença com 138 casos, no Amazonas a taxa de incidência foi de 0,12. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Devido a necessidade de identificar e tratar adequadamente casos positivos na FMT-HVD, diferentes metodologias são utilizadas no diagnóstico de rotina: 1) cultura do *Trypanosoma cruzi*, 2) xenodiagnóstico e 3) mapeamento da reação em cadeia da polimerase (PCR) do *T. cruzi* isolado de humanos, vetores e reservatórios.

1.11 FMT- HVD

A Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado é considerado centro de referência nacional e mundial para o tratamento de enfermidades tropicais. Destinada a desempenhar três funções básicas: Prestar assistência à saúde, desenvolver pesquisa científica, contribuir para a formação dos recursos humanos nas áreas de doenças tropicais.

Também tem em suas instalações, um ambulatório com 14 consultórios médicos, laboratórios de análises clínicas automatizado, serviços de hemoterapia, radiodiagnóstico e ultra-sonografia, e presta assistência no atendimento, diagnóstico e tratamento dos pacientes chagásicos agudos ou crônicos oriundos da demanda espontânea ou de outros serviços do estado do Amazonas. Desenvolve suas atividades através da Diretoria de Ensino, Pesquisa e Controle de Endemias e demais. Faz um serviço terciário especializado em doenças infecciosas e parasitárias como a Doença de Chagas, localizado em Manaus, de referência nesta área para o Estado do Amazonas, Brasil.

1.11.1 Centro de Entomologia médica

O Centro de Entomologia médica é um laboratório da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado-FMT-HVD que cria insetos vetores de doenças como a malária, dengue, febre amarela urbana e silvestre, e entre elas, a doença de chagas. O insetário de triatomíneos da FMT/HVD, conta atualmente com cinco espécies de triatomíneos. A colônia é mantida para a realização do xenodiagnóstico, na rotina do ambulatório, tanto em casos agudos, como em crônicos, realizado ao longo dos últimos vinte anos, sem, entretanto, avaliar capacidade de hematófaga e a susceptibilidade das espécies que compõem a colônia.

2. JUSTIFICATIVA

A identificação e tratar adequado de casos da doença de chagas, é feita por diferentes metodologias e entre elas exames parasitológicos. Na fase crônica da doença testes sorológicos são utilizados, mas nem sempre são sensíveis, resultando em testes falso-positivos e falso-negativos, necessitando de confirmação por meio de exames parasitológicos complementares. O Xenodiagnóstico é um procedimento em que barbeiros são utilizados como meio biológico de cultura para a detecção da infecção pelo *T. cruzi* em mamíferos. Estudos sugerem que a xenopositividade em pacientes crônicos, possa também está associada com a espécie de triatomíneo empregada nos exames. Dentro desta premissa torna-se relevante a avaliação da susceptibilidade de triatomíneos criados em laboratório, à infecção pelo *Trypanosma cruzi* contribuindo dessa maneira, no diagnóstico e informações para o controle pós- terapêutico da doença de Chagas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a susceptibilidade de *Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata* à infecção pelo *T. cruzi* após submissão ao xenodiagnóstico de pacientes com Doença de Chagas.

3.2 Específicos

Quantificar o sangue ingerida por *Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata* após o xenodiagnóstico;

Estimar a taxa de infecção pelo *T. cruzi* em *Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata* após submissão ao xenodiagnóstico de pacientes com Doença de Chagas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização da Área de estudo

A presente pesquisa foi realizada no Centro de Entomologia Médica da Fundação de Medicina Tropical- Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT/HVD/AM), localizada na Av. Pedro Teixeira, s/n- Dom Pedro, Manaus – AM, 69040-000.

4.2 Caracterização do tipo de estudo

Estudo do tipo descritivo transversal, onde foi avaliada a susceptibilidade de *Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata* à infecção pelo *T. cruzi* por meio de Xenodiagnóstico.

4.2.1 Aspectos Éticos

O presente trabalho faz parte de um dos objetivos do projeto “Triatomíneos do estado do Amazonas: Distribuição espacial bioecologia e importância epidemiológica”.

Aprovado pelo Comitê de Ética da FMTHVD sob o número do CAAE 96950118.5.0000.0005

4.3 Procedimentos

Os triatomíneos utilizados neste trabalho são oriundos de colônias estabelecidas no insetário de triatomíneos do Centro de entomologia médica da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT/HVD/AM).

4.3.1 Triatomíneos e Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico direto foi realizado de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) seguido pelo centro de entomologia da FMT/HVD/AM. Para as observações propostas neste trabalho foram acompanhados grupos de 20 ninfas de cada espécie (*Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata*) no 3^a estágio utilizadas no xenodiagnóstico de 16 pacientes com doença de chagas realizados nos anos de 2019 e 2020, 2021. As ninfas estavam em jejum de 30 dias. As ninfas foram pesadas, em uma balança de precisão, antes e após do xenodiagnóstico.

Para o xenodiagnóstico de cada paciente, foram utilizados 2 recipientes de criação (com identificação do paciente e data), cada um com 20 ninfas de cada espécie, estes foram fixado na superfície da face póstero-lateral de cada braço do paciente, possível chagásico crônico ou agudo, por um tempo de 30 minutos. Em seguida foi verificado se todas as ninfas fizeram o repasto. As ninfas foram mantidas em seus recipientes de criação até o tempo ideal para a primeira leitura do xenodiagnóstico.

Foram realizadas cinco leituras para as duas espécies em estudo, com um intervalo de tempo de 15, 60, 90, 180 dias respectivamente após o repasto sanguíneo. Em cada leitura foram utilizadas 5 ninfas de cada espécie e cada ninfa foi observada individualmente.

As fezes, urina e/ou os intestinos dos triatomíneos, foram obtidos por método de compressão abdominal ou dissecação e colocados em solução fisiológica em uma lamina e lamínula, e examinados em microscópio óptico em aumento de 40x para a análise quanto a presença de formas Epimastigotas e Tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*. Foi diariamente observado e registrado a taxa de mortalidade e sobrevivência das ninfas, bem como mudança de estágio.

4.4 Coleta e Análises de dados

Os dados foram tabulados em planilhas e as variáveis estudadas foram submetidas a testes de normalidade para definir o tipo de estatística a ser realizada, paramétricos ou não paramétricos. O intervalo de confiança foi de 95% ($\alpha=0,05$). Os dados gerados foram plotados em planilha de Excel e analisados pelo Programa Bioestat versão 5.0 for Windows.

5. RESULTADOS

De um total de 16 pacientes portadores da Doença de Chagas Crônica, que realizaram o xenodiagnóstico, foram observadas e analisadas as fezes dos triatomíneos através de microscopia óptica, em 496 lâminas (107 lâminas de exames realizados a partir de abril 2019, e 389 em 2020 até agosto de 2021).

Quantificação do sangue ingerida por *Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata* após o xenodiagnóstico

A quantidade de sangue ingerida por *Rh. prolixus* mostrou-se maior em relação a quantidade de sangue ingerida pela espécie *T. maculata*. A média do peso da espécie *T. maculata* antes do repasto sanguíneo foi de 0,068g e após o repasto foi 0,211g, com um aumento de 0,143g. A média do peso antes do repasto sanguíneo de *Rh. prolixus* foi de 0,033g e após o repasto foi de 0,232g com um aumento de 0,199g (Figura 3).

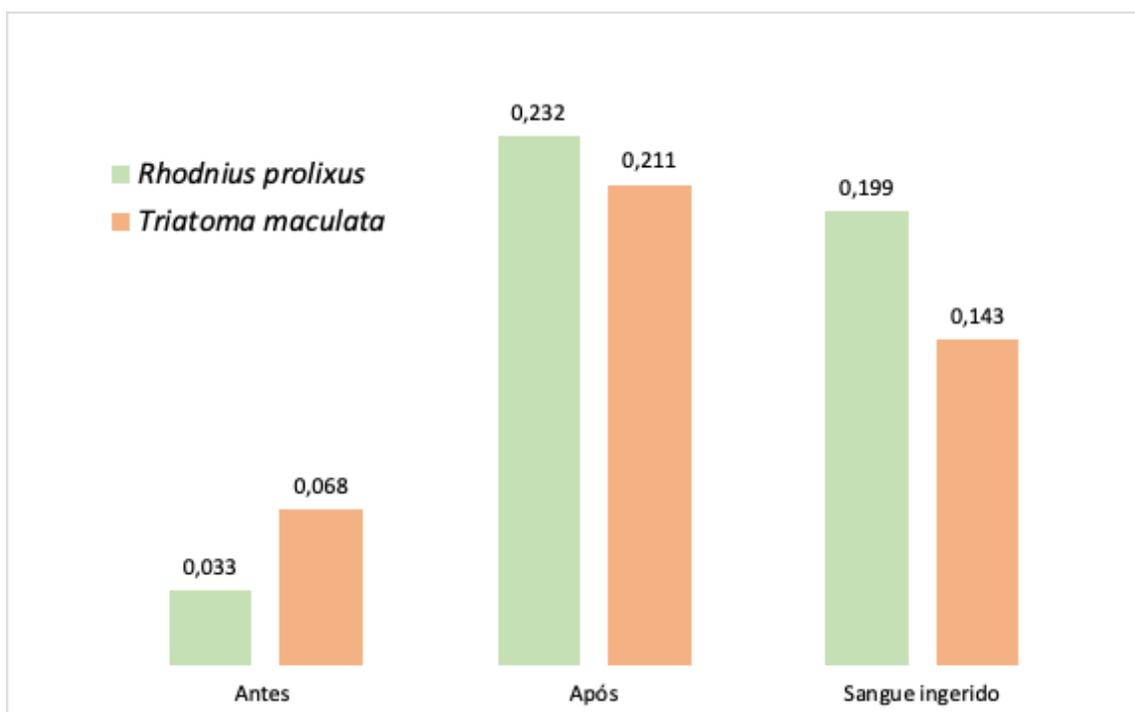


FIGURA 3: Peso de *Triatoma maculata* e *Rhodnius prolixus* antes e após o repasto sanguíneo

Taxa de infecção pelo *T. cruzi* em *Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata* após submissão ao xenodiagnóstico de pacientes com Doença de Chagas

Após 14 ± 16 dias após o xenodiagnóstico todos os triatomíneos sobreviventes fizeram muda do 3° para o 4° estágio ninfal. Após 180 dias a mortalidade observada em *T. maculata* foi de 23,5% e em *Rh. prolixus* de 15%. Não foi observado *Trypanosoma cruzi* ou outro flagelado nas fezes das duas espécies de triatomíneos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição da leitura do conteúdo intestinal de *T. maculata* e *Rh. prolixus* após o repasto sanguíneo em pacientes portadores de doença de Chagas crônica

Leitura do Xenodiagnóstico	<i>T. maculata</i>	<i>Rh. prolixus</i>
15 dias	Negativo	Negativo
60 dias	Negativo	Negativo
90 dias	Negativo	Negativo
180 dias	Negativo	Negativo

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo se apresenta o resultado de observações sobre a susceptibilidade de duas espécies de triatomíneos utilizados no exame parasitológico complementar para diagnóstico da doença de Chagas crônica, uma doença considerada ausente na Amazônia durante muito tempo, e cujo aumento no número de casos tem crescido nas últimas décadas. Em 2020, foram confirmados 146 casos de DCA no Brasil, com uma letalidade de 2% (3/146). A região Norte apresentou a maior taxa de incidência da doença com 138 casos, e no Amazonas a taxa de incidência foi de 0,12 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Esses dados estão associados principalmente aos surtos de transmissão por via oral ocasionados pelo consumo de sucos dos frutos de palmeiras sem a regulamentação sanitária, como o açaí (*Euterpe oleraceae*) e pataúá (*Oenocarpus bataua*). Nessa fase ocorre alta parasitemia e a vigilância da malária tem sido uma ferramenta importante no diagnóstico da doença, através do exame da gota espessa (Monteiro et al., 2021).

Entretanto, a fase crônica da doença de Chagas é caracterizada por baixos níveis de parasitas circulantes no sangue e títulos altos de anticorpos específicos contra antígenos, sendo muito importante e necessário o uso de métodos complementares como é o caso do xenodiagnóstico, tendo como alvo a busca do parasita *T. cruzi* e assim auxiliar no controle pós-terapêutico, particularmente de pessoas que se manifestaram com a doença aguda, fizeram tratamento mas não houve desfecho clínico. Após vinte a trinta anos, cerca de 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a fase crônica, sintomática, com diferentes formas clínicas: cardíaca, digestiva ou neurológica (MONCAYO, 1999; ARAÚJO-JORGE, 2000). No Brasil foram registradas 29.003 requisições de exames para DC em 2020, 33,7% (9.777) foram da região Norte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Na busca do triatomíneo mais adequado ao xenodiagnóstico, diversos trabalhos têm sido feitos, avaliando a susceptibilidade dos triatomíneos ao *T. cruzi*, demonstrando às vezes, resultados antagônicos da relação biológica triatomíneo-*Trypanosoma* (SILVA.I.G. et al., 1993) através das variáveis: estágio ninfal, capacidade de ingerir sangue, localidade dos triatomíneos e das cepas de *T. cruzi*. Dentro desta premissa o presente trabalho buscou avaliar a susceptibilidade de *Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata* à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em pacientes com DCC para melhor

padronização. A presença de palmeiras, como por exemplo *Euterpe oleraceae* e *Oenocarpus bataua*, poder ser determinante ambiental de infestação. Pois são ecótopos naturais de triatomíneos silvestres e, muitas vezes, estão próximas de habitações humanas, podendo constituir um risco para a população residente (RICARDO-SILVA *et al.*, 2012).

O xenodiagnóstico é considerado positivo, quando há o encontro de pelo menos uma forma de tripomastigota no conteúdo intestinal do inseto. O resultado negativo nas observações do conteúdo intestinal dos triatomíneos, pode caracterizar ausência de parasitemia nos pacientes, ou que as espécies submetidas ao xenodiagnóstico não são susceptíveis a infecção pelo parasito. Com a metodologia utilizada, esse resultado já era esperado uma vez que na fase crônica da doença de chagas, há baixos níveis de parasitas circulantes. No entanto, atualmente existem ferramenta mais sensíveis que ao serem utilizadas, aumentam a possibilidade de detecção do DNA do *T. cruzi* no conteúdo intestinal de triatomíneos utilizados no xenodiagnóstico como por exemplo a PCR (Santana *et al.*, 2014). Lamentavelmente é uma metodologia ainda não utilizada na rotina dos serviços de saúde, particularmente na Amazônia onde a estruturação desses serviços ainda não está estabelecida. Resultados negativos podem gerar uma interpretação equivocada da condição de saúde das pessoas portadoras de chagas, diferentes dos resultados positivos, que podem ser úteis principalmente para evidenciar desfecho e avaliar a eficácia do tratamento específico.

Nesse contexto, seria de grande relevância a implantação de uma metodologia mais sensível para o diagnóstico complementar dos pacientes acompanhados no ambulatório, onde são solicitados rotineiramente o xenodiagnóstico.

7. CONCLUSÃO

Entre as duas espécies observadas, *Rh. prolixus* ingeriu maior quantidade de sangue;

Não se observou infecção das duas espécies pelo *T. cruzi*

8. REFERENCIAS

ABALOS, J.W. **Health education and community participation in the eradication of Chaga's disease.** Rev. Fac. Cienc. Méd. Córdoba, v. 25, n.3, p 279-283, 1967.

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S. **Portal da doença de chagas; Ciclo evolutivo.** 2017.
ARAÚJO-JORGE, T. C, CASTRO, S. L. Doença de Chagas: Manual para experimentação animal: Editora FIOCRUZ; 2000.

BARBOSA, M.G.V.; MARCOS, J.; FERREIRA, B.; RUTH, A.; ARCANJO, L.; AMELIA, R. *et al.* Chagas disease in the State of Amazonas: history, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.48 , Uberaba , 2015.

BRICEÑO-LEON, R. **Aspectos sociales, económicos, políticos, culturales y psicológicos.** In: Storino R, Miles J, organizadores. **Enfermedad de Chagas.** Buenos Aires: Mosby Doyma; 1994. p. 534-41.

BALLESTER-GIL, L. M. *et al.* **The knowledge of chagasic patients about their disease: collective construction of a research instrument and test of its applicability,** 2007.

COURA, José Rodrigues. **The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , v. 110, n. 3, p. 277-282, May 2015

COURA, José Rodrigues; DIAS, João Carlos Pinto. **Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 31-40, 2009.

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

CARCAVALLO, R.U, RODRIGUEZ M.E.F, SALVATELLA, R, CASAS, S.I.C, SHERLOCK I. S, GALVÃO C. **Hábitos e fauna relacionada. Atlas dos vetores da doença de chagas nas Américas.** Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997. p. 561-600.

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 morbida do homem.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159–218.

CASTRO, T. C. A. **Doença de chagas: manual para experimentação animal.** Instituto Oswaldo Cruz. 2000; EDITORA FIOCRUZ:368 p.

CERISOLA, J. A.; ROHWEDDER, R.; SEGURA, E. L.; PRADO, C. E.; ALVAREZ, M. MARTINI, G .J. W. **El xenodiagnóstico.** Buenos Aires: Imp Inst Nac Invest Cardiovasc; 1974.

DIAS, J.C.P. **Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado.** Cad Saúde Públ, 2001; 17: 165-169.

DIAS, J.C.P. **Controle da doença de Chagas**. In: Dias J.C.P.; Coura J.R. organizadores. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997; p. 453-467

DIAS, E. **Técnica do xenodiagnóstico na molestia de Chagas**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1945; 35:335-42.

FREIRE, P. **Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa**. São Paulo: Paz e Terra; 1996.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4ª. ed. São Paulo: Atlas, 2009.

GALVÃO, C.; CARVALHO, R.U.; ROCHA, D. S.; JUBERG, J. **A check-list of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes**, 2003.

GONZÁLEZ, A. F.; CUARTERO, I.G.; DÍEZ, A. G.; FERRERAS, P. **Infecciones por protozoos hemoflagelados: leishmaniose, enfermedad de Chagas y tripanosomiasis de Medicina Interna**. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Albacete. España Medicine. v.11, n 54. p. 3194, 2014.

GWATIRISA, P. R.; NDAMBA, J.; NYAZEMA, N.Z. **The impact of health education on the knowledge, attitudes and practices of a rural community with regards to schistosomiasis control using a plant molluscicide, *Phytolacca dodecandra***. Cent Afr J Med 1999; 45(4):94-97.

LAZZARI, C. R.; **Biologia e Comportamento in Vetores da doença de chagas no Brasil** [recurso eletrônico] / Cleber Galvão (organizador). Curitiba : Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. 1 recurso eletrônico ; (289 p.) – (Série Zoologia : guias e manuais de identificação / Sociedade Brasileira de Zoologia)

LENT, H., & WYGODZINSKY, P. (1979). **Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease**. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 1979; 163: 123–520.

LUITGARDS-MOURA, J.F.; VARGAS, A.B.; ALMEIDA CE, MAGNO-ESPERANÇA, G.; AGAPITO-SOUZA, R.; FOLLY-RAMOS, E.; COSTA, J.; TSOURIS, P.; ROSA-FREITAS, M.G. **A *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae) population from Roraima, Amazon Region, Brazil, has some bionomic characteristics of potential Chagas disease vector**. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2005. 47: 131-137

LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. **Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi***. In: Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Netto; M.; editores. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. p. 344-78

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos**. Brasília: Ministério da Saúde; 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso. Secretaria de Vigilância em Saúde**, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010; 8. ed. rev. – Brasília 444 p. : Il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. : **Epidemiological Report – Chagas disease**, 2021

MONCAYO, A. **Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999**; 94 Supl 1:401-4

NOGUEIRA, R. **Elaboração e análise de questionários: uma revisão da literatura básica e a aplicação dos conceitos a um caso real**. Rio de Janeiro : UFRJ/COPPEAD, 2002.

OMS/ PAHO/ **Chagas disease**. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=en. Accessed November 21, 2019.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A.; MULLER, C. A.; MOREIRA, C. J. C. **Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas disease: 4 - The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different Trypanosoma cruzi stocks**. Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 165-177

RICARDO-SILVA, A.H.; LOPES, C.M.; RAMOS, L.B.; MARQUES, W.A.; MELLO, C.B.; DUARTE, R.; DE LA FUENTE, A.L.; TOMA, H.K.; REBOREDOOLIVEIRA, L.; KIKUCHI, S.A.; BAPTISTA, T.F.; SANTOS-MALLET, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.; GONÇALVES, T.C. Correlation between populations of Rhodnius and presence of palm trees as risk factors for the emergence of Chagas disease in Amazon region, Brazil. Acta Trop 2012

SANTANA, R.A.G.; MAGALHÃES LKC, MAGALHÃES LKC. et al. Trypanosoma cruzi strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. Parasites Vectors 2014;7, 267.

SCHOFIELD, C. J., JANNIN J., & SALVATELLA, R. **The future of Chagas disease control. Trends in Parasitology**, 2006; 22: 58

SHIKANAI-YASUDA, M. A; CARVALHO, N. B. **Oral transmission of Chagas disease**. Clin Infect Dis. 2012 Mar;54(6):845-52.

STRASEN, J.; WILLIAMS, T.; ERTL, G.; ZOLLER, T.; STICH, A.; RITTER, O. **Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. Clinical Research in Cardiology**. 2014;103(1):1-10.

SILVA.I.G.; OSTERMAYER,A.L. & SILVA,H.H.G. Importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da suscetibilidade triatomínica ao Trypanosoma cruzi. Rev.Soc.Bras. Med.Trop., 26:19-24, 1993.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. **The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited**, vol 31 (472-481), 2001.

VINHAES, M. C.; DIAS, J.C.P. **Doença de Chagas no Brasil**. Cad Saude Publica. 2000; 16 Supl 2:7-12.

WHO (World Health Organization). Em: <<http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf>> Acessoem 11 de junho, 2019.