



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**

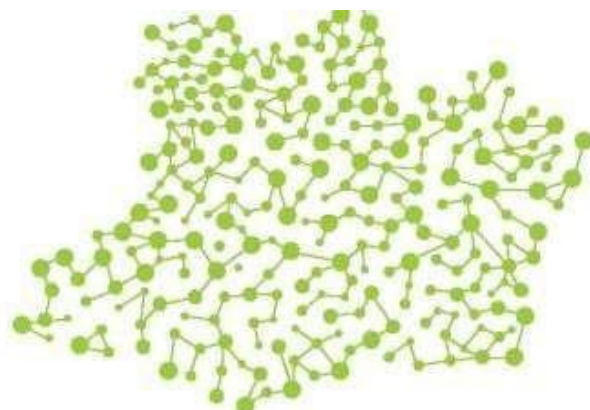


**TRANSMISSÃO ORAL DO *Trypanosoma cruzi*:
HISTÓRICO DOS SURTOS DA DOENÇA DE CHAGAS NO ESTADO DO
AMAZONAS**

DÉBORA RAYSA TEIXEIRA DE SOUSA

MANAUS

2019



DÉBORA RAYSA TEIXEIRA DE SOUSA

**TRANSMISSÃO ORAL DO *Trypanosoma cruzi*:
HISTÓRICO DOS SURTOS DA DOENÇA DE CHAGAS NO ESTADO DO
AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

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

Co-orientador (a): Prof^a Dr Jorge Augusto de Oliveira Guerra

**MANAUS
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

- S696 Teixeira de Sousa, Débora Raysa
Transmissão oral do Trypanosoma cruzi: Histórico dos surtos da doença de Chagas no Estado do Amazonas / Débora Raysa Teixeira de Sousa. Manaus: [s.n], 2017.
95 f.: il.; 27 cm.
- Dissertação - Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2017.
Inclui bibliografia
Orientador: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra
Coorientador: Jorge Augusto de
1. Doença de Chagas . 2. Trypanosoma cruzi . 3. Transmissão oral . 4. Amazônia Brasileira. I. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra (Orient.). II. Jorge Augusto de Oliveira Guerra (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Transmissão oral do Trypanosoma cruzi: Histórico dos surtos da doença de Chagas no Estado do Amazonas.

FOLHA DE JULGAMENTO**TRANSMISSÃO ORAL DO *Trypanosoma cruzi* :
HISTÓRICO DOS SURTOS DA DOENÇA DE CHAGAS NO ESTADO DO
AMAZONAS****DÉBORA RAYSA TEIXEIRA DE SOUSA**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

DEDICATÓRIA

Dedico à memória da minha amada mãe Raimunda Sena Teixeira de Sousa, que sempre lutou para dar o melhor estudo para os filhos e me ensinou que a melhor herança que ela poderia nos deixar eram os estudos. Mãe que abdicou de ter os filhos por perto, pois acreditava que em uma cidade maior nós teríamos melhores oportunidades.

Dedico a meu pai Donaldo Lobato de Sousa, que junto à minha mãe, não mediu esforços para me criar com todo amor e carinho e me deu todo apoio para que eu conseguisse chegar até aqui.

Ao meu irmão Diego Rayan Teixeira de Sousa, que me inspirou profissionalmente e por intermédio dele iniciei minha vida profissional nesta instituição - Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, como estagiária. Ele entende sobre as dificuldades da vida acadêmica e por isso sempre me dá bons conselhos.

Dedico a minha família que mora comigo aqui em Manaus que presenciaram diariamente a minha trajetória: minha prima e irmã de coração Greicy Marília Teixeira Ferreira e minha madrinha Silvia Sena Teixeira Ferreira que sempre cuidou de mim como filha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo simples fato de viver e ter saúde, pelas bênçãos diárias, e pela sua constante presença na minha vida e da minha família, me dando forças para seguir em frente, pois sem minha fé eu não teria chegado até aqui.

À minha amada família, pelo apoio constante nas minhas conquistas. Aos meus pais, pela dedicação e amor e por terem me incentivado a sempre buscar mais conhecimento e ao meu irmão por me ajudar a traçar minha história.

Às minhas tias, em especial, Marilene Sena, Maria Sena, Almiralva Sousa, Celinha Sousa, à minha irmã Greicy Marília; à minha avó Maria Madalena, pelo apoio e pelas preocupações, obrigada pelas orações e palavras de incentivo.

À minha tia/madrinha Sílvia, minha mãezinha, obrigada por me receber na sua casa, por sempre me apoiar, estar comigo em todos os momentos de fraqueza e sempre me dizer que tudo ia dar certo. Não tenho como retribuir tudo que a senhora faz por mim.

Àos meus amigos Luana, Melany, Tayná e José Carlos por torcerem pelas minhas vitórias, mesmo estando longe ou sem tempo para nos encontrarmos.

À Dra Rossicléia Lins, por ser minha primeira mãe acadêmica, pelos ensinamentos, pelas broncas, pelos conselhos e por sempre me apoiar e acreditar no meu potencial.

À minha orientadora Dr^a Graça Barbosa, por todos os ensinamentos, pelos conselhos, broncas, e pela ótima orientação.

Ao meu co-orientador Dr. Jorge Guerra, agradeço pela confiança em mim, pela disposição em ajudar e pela contribuição na finalização dos resultados.

Ao Dr. Henrique Silveira, pelos ensinamentos e paciência, pois sempre que estive no Brasil e até mesmo longe mostrou-se disposto a me ajudar. Sua contribuição foi imprescindível.

Ao MSc. George Villarouco, pela abnegação do próprio tempo para me ajudar com o sequenciamento, pelas dicas e sugestões, agradeço imensamente.

Ao Dr. Vanderson Sampaio e a MSc. Ana Ruth Lima Arcanjo, por me ajudarem na obtenção dos dados.

Aos funcionários do Laboratório de Entomologia, Silvana Arakian, Yolanda Noguth, Auxiliadora Chiarion, Flávio Fé, Íria Cabral Rodriguez, Silvia Justiniano, Grafe Pontes e especialmente ao senhor Nelson Fé pelos ensinamentos ao longo desses anos.

À Dra. Rosa Amelia G Santana pelos ensinamentos, paciência, pelos auxílios nas técnicas laboratoriais e também pelos conselhos pessoais e acadêmicos.

Às minhas amigas de laboratório Jessica Ortiz e Arineia Soares por me ajudarem nas análises dos dados, assim como aos meus outros amigos que sempre estavam dispostos a ajudar no que fosse possível, Evelyn Vaz, Sabrina Brito, Susan Smith, Rubens Andrade Junior, Kenny Rodrigues, Lucas Ferreira, Ademir Bentes, Maurício Oliveira, Matheus Martins, Denisson Vidal, Emilly Moura, obrigada pela companhia dentro do laboratório, pelas risadas e pelos momentos de descontração.

Agradeço a todos que fazem parte do grupo de pesquisa em doença de Chagas Dr. João Farias Frads, especialmente a Katia Coceiro, Karla Petrucelli, Alba Brandão, Monica Hosannah, bem como ao de pesquisa em Leishmaniose que são nossos parceiros e colaboradores.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM pela bolsa de estudos.

À Universidade do Estado do Amazonas por oportunizar a formação de profissionais qualificados.

À Fundação de Medicina Tropical- HVD pelo suporte e estrutura para execução do projeto de dissertação.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pelos seus conhecimentos e experiências transmitidas. As secretárias Conceição Tufic e Iza Freitas pela amizade e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos colegas da Turma de Mestrado - 2017, pelo apoio e convívio ao longo dessa trajetória.

O que construí ao longo destes dois anos só foi possível pela presença de muitas pessoas essenciais e importantes na minha vida.

Obrigada!

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORA

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa e pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

Na Amazônia a doença de Chagas-DC aguda se apresenta de maneira isolada ou em surtos, sobretudo ligados a alimentos contaminados. No Amazonas já ocorreram 6 surtos todos relacionados ao consumo do açaí. Este trabalho tem como objetivo conhecer e descrever informações sobre os surtos da DC por transmissão oral ocorridos no estado do Amazonas. Os dados foram obtidos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação-SINAN e prontuários dos pacientes atendidos no ambulatório de DC da Fundação Dr. Heitor Vieira Dourado de Medicina Tropical-FMTHVD, que tinham em comum a mesma história epidemiológica. Os 6 surtos ocorreram entre 2004-2018 em 5 municípios (Tefé-2004, Coari-2007, Santa Isabel do Rio Negro-2010, Carauri-2011-2015 e Lábrea-2018) e 106 pessoas foram afetadas. A maioria, 60 (57%) foram pacientes do sexo masculino; a faixa etária variou desde crianças de 8 meses até idosos de 82 anos. Em todas as situações, mais de um membro da mesma família ou parentes próximos, bem como amigos ou vizinhos, foram afetados, e todos relataram beber suco de açaí. Foram relatados sintomas inespecíficos, sendo a síndrome febril frequente em 99% dos pacientes, astenia 64,9%, mialgia 53,2% e cefaléia 51%. A meningoencefalite foi observada em dois pacientes e alterações cardíacas em 24/54 (44,4%). O diagnóstico inicial foi realizado por exames parasitológicos em 92 (87%) dos pacientes; a gota espessa positivou em 91 (86%) dos envolvidos; outros exames complementares também foram realizados como a hemocultura, xenodiagnóstico, xenocultura e PCR. Os exames sorológicos foram importantes no diagnóstico de assintomáticos, 9,4%. A linhagem do parasito encontrada nos isolados dos pacientes foi Z3 (TcIII/TcIV) e TcIV. O perfil clínico e epidemiológico dos surtos ocorridos no Amazonas são semelhantes e demonstraram que na transmissão oral qualquer pessoa está vulnerável à doença.

Palavras Chaves: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Transmissão oral, Amazônia brasileira.

ABSTRACT

In the Amazon, acute Chagas disease is isolated or in outbreaks, mainly related to contaminated food. In Amazonas already occurred been 6 outbreaks

ball related to açaí consumption. This work aims to know and describe information about the outbreaks of CD by oral transmission occurred in the state of Amazonas. The data were obtained from the SINAN Notification of Injury Information System and medical records of the patients attending the DC ambulatory of the Dr. Heitor Vieira Dourado Foundation of Tropical Medicine-FMTHVD, who had the same epidemiological history in common. The 6 outbreaks occurred between 2004-2018 in 5 municipalities (Tefé-2004, Coari-2007, Santa Isabel do Rio Negro-2010, Carauri-2011-2015 and Lábrea-2018) and 106 people were affected. The majority, 60 (57%) were male patients; the age range varied from 8 months old to 82 year old. In all situations, more than one member of the same family or close relatives, as well as friends or neighbors, were affected, and all reported drinking açaí juice. Nonspecific symptoms were reported, with febrile syndrome being frequent in 99% of the patients, asthenia 64.9%, myalgia 53.2% and headache 51%. Meningoencephalitis was observed in two patients and cardiac alterations in 24/54 (44.4%). The initial diagnosis was made by parasitological exams in 92 (87%) of the patients; the thick drop was positive in 91 (86%) of those involved; other complementary tests were also performed such as blood culture, xenodiagnosis, xenoculture and PCR. Serological tests were important in the diagnosis of asymptomatic patients, 9,4%. The parasite lineage found in the isolates of the patients was Z3 (TcIII / TcIV) and TcIV. The clinical and epidemiological profile of outbreaks in Amazonas are similar and have shown that in oral transmission, any person is vulnerable to the disease.

Keywords: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Transmissão oral, Amazônia brasileira.

RESUMO LEIGO

Nos últimos anos, na Amazônia, houve um aumento do número de casos de doença de Chagas (DC). Causada por protozoários de nome *Trypanosoma cruzi*, pode ser transmitida ao homem durante o contato com as fezes ou urina de um inseto chamado barbeiro, contaminadas com o parasito. Outras formas de transmissão podem ocorrer como por exemplo, os casos de surtos ocorridos na região, relacionados ao consumo do açaí. Esse trabalho descreve informações sobre os pacientes de 6 surtos de DCA ocorridos no estado do Amazonas, entre 2004 a 2018. Foram acometidas 106 pessoas; 57% do sexo masculino; a faixa etária variou entre crianças de 8 meses até idosos de 82 anos. Em todas as situações, mais de um membro da mesma família ou parentes próximos, bem como amigos ou vizinhos, foram afetados, e todos relataram beber suco de açaí. A febre foi frequente em 99% dos pacientes, seguida da fraqueza 64,9%, dores musculares 53,2% e dor de cabeça 51%; a meningite foi observada em dois pacientes e alterações no coração em 44,4%. O principal exame utilizado para descobrir a doença nos pacientes foi a gota espessa (gota de sangue do dedo anelar). As informações levantadas mostraram que qualquer pessoa está vulnerável à doença quando ocorre a transmissão por alimentos contaminados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	16
Figura 2: Mapa da distribuição das DTU na América Latina.	19
Figura 3: Distribuição de casos de doença de Chagas relatados à OMS, em todo o mundo, 2010-2013.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

ADC/IEC/SVS - Ambulatório de Doença de Chagas do Instituto Evandro Chagas
DC- Doença de Chagas
DCA- Doença de Chagas Aguda
DNA- Ácido desoxirribonucléico
DTUs- Unidades Discretas de Tipagem
ECG - Ecocardiograma
ELISA -Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FCI – Fase Crônica Indeterminada
GE- Gota Espessa
GT Chagas/DIVEP- Grupo Técnico de Doença de Chagas da Diretoria de Vigilância Epidemiológica
GT-Chagas/MS- Grupo - Técnico de Doença de Chagas do Ministério da Saúde
HE- Hemoaglutinação
IFI- Imunofluorescência Indireta
IgG- Imunoglobulina G
IgM- Imunoglobulina M
LIT - Liver Infusion Tryptose
mL- Mililitros
µL- Microlitros
MS – Ministério da Saúde
OMS -Organização Mundial de Saúde
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
RS - Rio Grande do Sul
SNC - Sistema Nervoso Central
STORCH -sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovirose e herpes
SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
T. cruzi- Trypanosoma cruzi
WB - Western-blot
XD- Xenodiagnóstico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Doença de Chagas	15
1.2 O parasito	15
1.2.1 Ciclo de Vida do <i>T. cruzi</i>	15
1.2.2 Diversidade genética	17
1.3 Vetor	19
1.4 Reservatório	20
1.5 Formas de Transmissão	21
1.6 Aspectos clínicos da DC	23
1.7 Diagnóstico Laboratorial	24
1.7.1 Exames Parasitológicos.....	26
1.8 Tratamento	27
1.9 Aspectos epidemiológicos	28
1.9.1 Aspectos epidemiológicos na identificação de um surto.....	30
1.10 Histórico sobre os surtos por transmissão oral da DCA nas Américas.....	31
1.10.1 Doença de Chagas na Amazônia	32
1.10.2 Doença de Chagas no Amazonas	33
1.10.2.1 Açaí.....	33
1.10.2.2 Relevância do estudo	34
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	36
4. LIMITAÇÕES	59
5. PERSPECTIVAS FUTURAS	60
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
8. APÊNDICES E ANEXOS.....	67
8.1 Procedimentos Operacionais Padrão (POP) – Obtenção de dados	67
8.2 Procedimentos Operacionais Padrão (POP) – Extração de DNA.....	70
8.3 Procedimentos Operacionais Padrão (POP) – Procedimentos para realização da PCR	76

8.4 Procedimentos Operacionais Padrão (POP) – Purificação para sequenciamento do produto da PCR	82
8.5 Procedimentos Operacionais Padrão (POP) – Reação de sequenciamento	85
8.6 Parecer substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, descoberto pelo pesquisador Carlos Chagas em 1909 (1). É uma enfermidade tropical negligenciada, com grande impacto econômico e social(2), considerada um dos principais problemas de saúde pública na América Latina (1)(3). Nos últimos anos, tem se dispersado para outros continentes, apresentando modificações nos aspectos epidemiológicos. Na região Amazônica, a transmissão que causa os surtos e micro-surtos ocorre pela contaminação do suco açaí, tipo de alimento que faz parte da dieta alimentar da população, demandando a necessidade de mudanças na forma de vigilância epidemiológica diferente das outras regiões endêmicas (4,5).

1.2 O parasito

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, possui um único flagelo e uma organela localizada próximo ao núcleo, contendo o DNA mitocondrial, denominada de cinetoplasto (6).

É um parasito eclético, que apresenta ciclo evolutivo complexo, do tipo heteroxênico, desenvolvido em diferentes espécies de hospedeiros vertebrados (homens e outros mamíferos), onde realiza uma fase de multiplicação intracelular, e várias espécies de hospedeiros invertebrados (insetos triatomíneo) onde desenvolve uma fase de multiplicação extracelular (1,7).

1.2.1 Ciclo de Vida do *T. cruzi*

No hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* se desenvolve a partir do momento em que a forma infectante denominada de tripomastigota metacíclica, cai na corrente sanguínea e invade macrófagos. Dentro da célula, ocorrerá a diferenciação de tripomastigotas metacíclicas para formas amastigotas, que se multiplicam no citoplasma, e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos,

sendo liberados na corrente sanguínea, para infectar novas células de vários tecidos tais como muscular, cardíaco, digestivo e nervoso (8).

No hospedeiro invertebrado, o *T. cruzi* se desenvolve a partir do momento o triatomíneo, inseto, conhecido como barbeiro, se infecta com formas tripomastigotas sanguíneas, durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado. No tubo digestivo do barbeiro, essas formas diferenciam-se em epimastigotas e esferomastigotas, movimentando-se do intestino médio para o final do tubo digestivo, onde ocorrerá um processo denominado de metaciclogênese, e os parasitos transformam-se em tripomastigotas metacíclicas, que serão eliminadas pelas fezes do inseto durante o próximo repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado, iniciando assim um novo ciclo (Figura 1) (8).

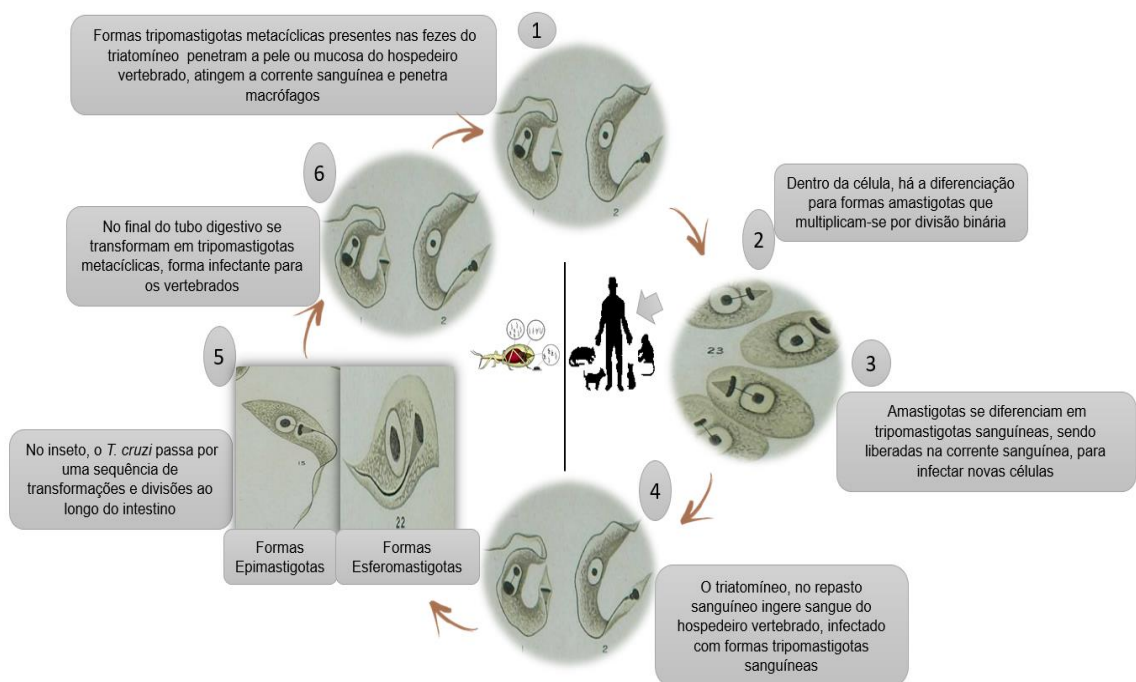


Figura 1: Ciclo de vida do *T. cruzi*. Fonte: imagens retiradas de <http://chagas.fiocruz.br/fisiologia/>; Chagas C, 1909. Elaborado por Sousa D, 2018.

1.2.2 Diversidade genética

Por ser um parasito versátil durante o ciclo biológico, o *T. cruzi* pode apresentar grande diversidade genética. Dependendo da abordagem e metodologia utilizada, ao longo dos anos, recebeu várias classificações (9,10):

Biodemas: Em estudos experimentais, conforme as características biológicas e histopatológicas o *T. cruzi* foi classificado em três grupos, biodemas I, II e III, que correlacionam as diferentes lesões histopatológicas na fase aguda e crônica da infecção, considerando-se o envolvimento cardíaco e as lesões neuronais. (11)(12).

Zimodemas: Miles et al., 1978 com base em isoenzimas, propuseram a classificação em subgrupos nomeados como zimodemas 1, 2 e 3(13)(14). Tibayrenc, 1991 relacionou a reprodução clonal envolvendo a distribuição de genótipos em populações (15), como consequência, a variabilidade genética e biológica deste parasito pode ser explicada pela evolução isolada de múltiplas linhagens clonais.

Linhagens: Em 1996, Souto et. al, descreveram os subgrupos chamados de linhagens I e II (16), posteriormente classificados como *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (17) na análise de regiões do DNA nuclear, sendo o *T. cruzi* II mais associado aos casos crônicos graves. El Sayed et. al em 2006 (18), publicaram o genoma completo do clone CL Brener e contribuíram para o achado de um terceiro grupo ancestral denominado *T. cruzi* III, que foi proposto a partir da análise de microssatélites e DNA mitocondrial(19).

Unidades discretas de tipagem-DTU: Em 2009, em um consenso, uma nova classificação a partir de características eco-epidemiológicas e de patogenicidade classificaram o *T. cruzi* em seis grupos (TcI-TcVI) denominados de DTUs com base no padrão de marcadores genéticos, bioquímicos ou biológicos (9). Uma sétima DTU associada à morcegos foi acrescentada posteriormente (20)(21)(22) (Figura 2), conforme características descritas a seguir:

T. cruzi I: é a DTU mais abundante nas Américas, relacionada ao ciclo silvestre e doméstico, com uma grande variedade e quantidade de mamíferos e os principais gêneros de triatomíneos vetores infectados naturalmente. A infecção humana por TcI é prevalente no norte da América do Sul, América Central e México, mais comum na fase crônica, caracterizada por manifestações cardíacas.

T. cruzi II: Isolada principalmente no ciclo de transmissão doméstico e tem pouca associação com mamíferos silvestres. Predomina na região sul e central da América do Sul. No Brasil é amplamente distribuído pelas regiões do nordeste, centroeste, sudeste e sul, mais comumente encontrado na fase crônica com manifestações cardíacas e síndromes do mega (21).

T. cruzi III: Está associado principalmente ao ciclo silvestre, encontrado em animais reservatórios não humanos e triatomíneos vetores(23); foi relatado em cães (24), tendo sido algumas vezes associada a casos humanos tanto na fase aguda quanto crônica (21)(25).

T. cruzi IV: Está associado predominantemente ao ciclo silvestre, encontrado na América do Norte e do Sul em primatas, quatis e guaxinins como principais hospedeiros, foi encontrado também em cães (24). Essa linhagem foi encontrada em amostras de paciente de um surto por transmissão oral ocorridos no estado do Amazonas, Brasil (26)(27).

T. cruzi V e T. cruzi VI: Associado ao ciclo doméstico e comumente presente em infecções humanas em países do sul da América do Sul, porém foi relatado raramente no Equador e Colômbia e Brasil (28).

TcBat: Recentemente a ocorrência de morcegos brasileiros infectados por *T. cruzi* tem sido reportados da floresta Amazônica até áreas do centro-oeste e sudeste do Brasil (20)(29). Esse grupo de isolados foi provisoriamente denominado por "Tcbat" e aguarda mais caracterizações para atribuição de uma DTU definitiva, potencialmente como uma sétima DTU, TcVII (21).

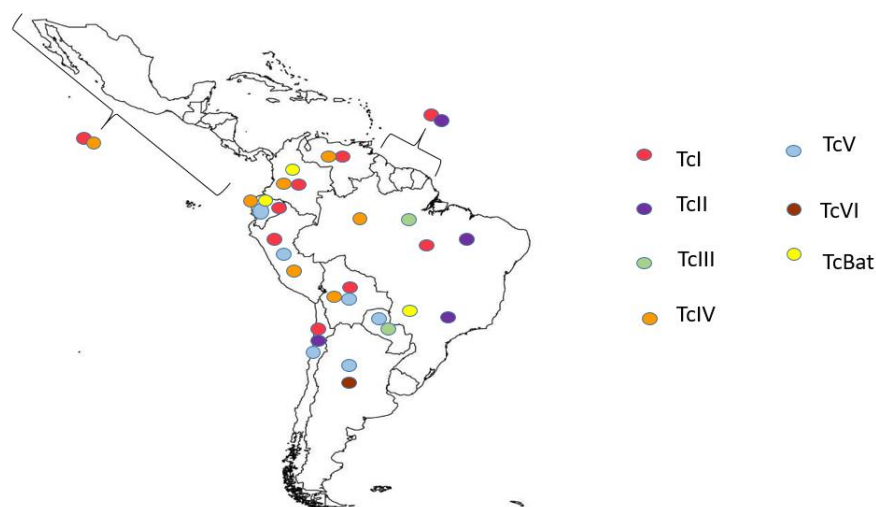


Figura 2: Mapa da distribuição das DTU na América Latina. Fonte: Sousa, 2018. Adaptado de Brenière et al., 2016 e Zingales et al., 2018.

1.3 Vetor

Os Triatomíneos pertencem à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. São insetos hemimetábolos cujo ciclo de vida envolve uma metamorfose incompleta que passa pelo ovo, evolui por cinco fases ninfais, até chegar à fase adulta (30)(31). Possuem hábitos noturnos, fotofobia, termotropismo positivo, presença de substâncias anticoagulantes e anestésicas na saliva. Esses insetos evoluem e procriam realizando hematofagia desde sua primeira fase de vida até adulto. Tal hábito permite um estreito relacionamento com animais reservatórios silvestres e domésticos (32)(33).

É um grupo numeroso e diversificado que coloniza ecótopos temperados, subtropicais e tropicais, principalmente nas Américas, onde provavelmente é o centro de origem destes vetores (32). São divididos em cinco tribos incluindo 18 gêneros e 148 espécies, dentre as quais 64 ocorrem no Brasil. Algumas poucas espécies podem ser encontradas nos Estados Unidos, centro-sul da África,

sudeste da Ásia e norte da Austrália (31). Os gêneros de maior importância epidemiológica são *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* (33).

Por serem insetos estritamente hematófagos, englobam espécies consideradas vetores do *T. cruzi*. Nesse aspecto, diferem de outros insetos hematófagos, (flebotomíneos e anofelinos), onde somente as fêmeas adultas se alimentam esporadicamente de de sangue (34). Em condições normais, os triatomíneos, em qualquer fase e sexo, realizam um repasto sanguíneo para o desenvolvimento do estágio ninfal e oviposição da fêmea. No entanto, estudos recentes realizados com *Rhodnius prolixus*, demonstraram novas opiniões relacionadas a alimentação desses vetores, foi observado sua capacidade de realizar refeições de açúcar artificial, mostrando uma nova opção a ser utilizada na manutenção de colônias (35).

A associação de triatomíneos com plantas sempre foi considerada um efeito secundário devido a preferência de habitat de seus hospedeiros vertebrados. Os triatomíneos coletados em campo geralmente são encontrados em um estado nutricional muito pobre, suportando longos períodos de jejum (36). O gênero *Rhodnius*, apresenta forte associação com palmeiras e bromélias e exibem uma variedade altamente diversificada de hábitos alimentares que sugam fluidos (36)(37).

Na Região Amazônica, várias espécies de triatomíneos silvestres têm sido encontradas, das quais pelo menos em 10 houve registro de infecção natural por flagelados do tipo *T. cruzi*. As espécies *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus* e *Panstrongylus geniculatus* foram anteriormente registradas no município de Manaus (4). Estas espécies são frequentemente encontradas com altas taxas de infecção natural pelo *T. cruzi* em diversos ecótopos naturais na Amazônia Brasileira, onde esporadicamente invadem as residências (38).

1.4 Reservatório

Para que o *T. cruzi* consiga completar o seu ciclo de vida ele precisa além de realizar uma fase do ciclo em triatomíneos (hospedeiros invertebrados),

passar por um hospedeiro vertebrado que pode ser o homem ou outras espécies de mamíferos, que tornam-se reservatórios, contribuindo na dispersão do *T. cruzi* e conseqüentemente da doença para diferentes ecótopos disponibilizando alternativas de transmissão do parasita. Marsupiais como os *Didelphis marsupialis* (gambás, mucuras), podem atuar como reservatórios e vetores ao mesmo tempo, a partir de achados de formas amastigotas de *T. cruzi* nas glândulas anais desses animais que por sua vez liberam um fluido que facilmente pode contaminar utensílios e alimentos (39).

De acordo com Herrera et al. (40), aproximadamente 180 espécies de mamíferos pertencentes as ordens: Didelphimorphia, Lagomorpha, Chiroptera, Rodentia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata, Perisodactyla, foram encontrados naturalmente infectados por *T. cruzi*, e dessa forma, têm um papel importante na manutenção e interação de ciclos doméstico, peridoméstico e silvestre da doença de Chagas, incluindo o homem que adoece e atua como reservatório.

1.5 Formas de Transmissão

O *T. cruzi* pode infectar o homem de diversas formas tais como: transmissão vetorial, oral, transfusão de sangue ou transplante de órgãos e congênita e acidentes laboratoriais.

Transmissão vetorial: é a forma clássica e a mais tradicional nas áreas onde o vetor é domiciliado. Pelo habito de defecarem durante ou logo após a hematofagia, a deposição de fezes contaminadas com as formas infectantes do *T. cruzi*, sobre a pele ou mucosas, atingem a corrente sanguínea (3). O período de incubação é de 4 a 15 dias(1)(42).

Transmissão pela Transfusão de sangue e transplante de tecidos/orgãos: essa forma de transmissão foi muito comum no Brasil e em países da América latina pela urbanização da DC e falta de controle nos hemocentros. Devido as altas taxas de transmissão, nos últimos anos, foi estabelecido a obrigatoriedade da triagem clínico-epidemiológica e sorológica na

maioria dos países endêmicos, com isso, atualmente, registra-se uma grande redução do risco da transmissão transfusional da doença de Chagas em toda a América Latina (41). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), com base no ano de 2010, estimaram em 0,18% a prevalência desta transmissão no Brasil (42). O país tem avançado não apenas na busca da segurança transfusional, mas também no processo de hemovigilância, com a instituição de um sistema nacional integrando hemocentros, vigilância epidemiológica e vigilância sanitária, o período de incubação desta varia de 30 a 40 dias ou mais (41).

Transmissão congênita, vertical ou materno- fetal: ocorre quando a mãe infectada com o parasito transmite o *T. cruzi* para a criança pela placenta. Na América Latina foram estimados mais de 15 mil casos de doença de Chagas congênita por ano, com análises mais recentes indicando estimativa de 8.668 crianças infectadas por transmissão vertical. No Brasil, a DC congênita é considerada aguda e, portanto, de notificação compulsória, pode ser transmitida em qualquer período da gestação ou durante o parto (42).

Transmissão acidental: Há registros de acidentes em diferentes contextos como laboratoriais, no manuseio de material contaminado, em trabalhos experimentais com mamíferos infectados e culturas, aerossóis de materiais infectados, infecção cirúrgica e coleta de sangue a partir de pessoas com infecção aguda. O processo de vigilância e controle deve incluir necessariamente o desenvolvimento de ações de educação com a verificação da utilização apropriada de equipamentos de proteção individual. O período de incubação é de até, aproximadamente, 20 dias (41).

Transmissão oral: essa forma ocorre quando há a ingestão de alimentos contaminados, tais como, ingestão de carne, alimentos ou bebidas não cozidas contaminadas com parasitos. É uma forma de transmissão muito antiga e comum entre mamíferos não humanos que se infectam ao ingerir triatomíneos, porém pouco relatada em humanos. Atualmente, é a causa mais comum da doença aguda ocasionando surtos em regiões endêmicas e não endêmicas. Período de incubação de 3 a 22 dias (41)(43).

1.6 Aspectos clínicos da DC

A doença de Chagas é classificada clinicamente em duas fases, aguda e crônica, e pode ou não manifestar-se com sintomas. De maneira geral é assintomática mas pode cursar como doença grave (44).

Na fase aguda a maioria dos pacientes são assintomáticos ou oligossintomáticos (41). Em casos de transmissão vetorial (período de incubação varia de 3 a 22 dias), podem ocorrer manifestações consideradas porta de entrada tais como sinal de Romaña (edema nos olhos unilateral) ou chagoma de inoculação (42,46).

No entanto, os sintomas mais comuns são facilmente confundíveis com outras doenças infecciosas, entre eles: febre prolongada, mal-estar, cefaléia, mialgias, astenia, edema de face ou membros inferiores, rash cutâneo, adenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, ascite, linfadenopatia e taquicardia (41); pode afetar o SNC (Sistema Nervoso Central) e embora seja raro, pode ocorrer meningoencefalite, com casos fatais, principalmente, em imunodeprimidos ou em crianças com menos de 2 anos (46).

Relatos em surtos de transmissão por via oral demonstraram a ocorrência de edema de face, icterícia, adenomegalia e alterações do ritmo cardíaco além dos sintomas já citados anteriormente (45).

Casos graves têm sido registrados em 13,3% dos casos, quase sempre relacionados à miocardite aguda e a manifestações hemorrágicas digestivas graves (7). A hemorragia representou um quadro exuberante na epidemia ocorrida no município de Navegantes, no Estado de Santa Catarina (região Sul do Brasil) (5).

No Amazonas, foi reportado um caso de meningoencefalite chagásica em uma paciente de 16 anos procedente do município de Tefé (46). Contudo, a maioria dos casos agudos possuem um prognóstico bom com o retardo dos sintomas mesmo sem intervenção de medicamentos (47).

Após o período que caracteriza a fase aguda da doença, e que dura cerca de seis a oito semanas, os pacientes entram na forma crônica que pode ser indeterminada (quando aparecem anticorpos *T. cruzi*-específicos na corrente sanguínea), mas são assintomáticos e não apresentam alterações no eletrocardiograma e na radiografia de tórax é a forma clínica de maior prevalência (41)(48) ou em menor porcentagem quando desenvolvem complicações cardíacas, digestivas ou mista (complicações cardíacas e digestivas) anos ou décadas após a infecção inicial.

A cardiopatia chagásica crônica apresenta-se clinicamente sob a forma de três síndromes fundamentais: insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo (49).

A digestiva caracteriza-se por dilatações patológicas de gravidade variável do esôfago e cólon, frequentemente associadas com manifestações cardíacas (50). Cerca de 20 a 30% dos pacientes na fase crônica desenvolvem a forma cardíaca, que pode levar à insuficiência cardíaca ou morte súbita.

1.7 Diagnóstico Laboratorial

O Diagnóstico de DC deve ser realizado tanto na fase aguda quanto na crônica, para isso é necessário a análise de evidências. Deve-se integrar a epidemiologia, análise clínica e o diagnóstico laboratorial a fim de aumentar o grau de confiabilidade do diagnóstico(41).

O diagnóstico laboratorial da infecção por *T. cruzi* por meio de diferentes técnicas laboratoriais deve seguir critérios definidos, a depender da fase da doença. Este exames são diferenciados em exames parasitológicos, sorológicos, cardiológicos e digestivos(41)(51).

A fase aguda é determinada pela presença de parasitos circulantes na corrente sanguínea e o diagnóstico padrão ouro são exames parasitológicos diretos de sangue periférico como: gota espessa, esfregaço sanguíneo, pesquisa à fresco e métodos de concentração. Recomenda-se usar diferentes métodos de exame parasitológico direto (41). Nos casos em que não se identifica o parasito

na pesquisa direta, a verificação da presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe Imunoglobulina M (IgM) no sangue periférico é considerada sugestiva da fase aguda quando associada a fatores clínicos e epidemiológicos compatíveis. O critério sorológico baseia-se em métodos indiretos para diagnóstico que podem ser realizados quando os exames parasitológicos forem negativos e a suspeita clínica persistir (41)(48).

O diagnóstico da fase crônica indica-se principalmente testes sorológicos, com alta sensibilidade e de alta especificidade que detectam anticorpos Imunoglobulina G (IgG) anti-*T. cruzi*. Para um diagnóstico confirmatório, pelo menos dois testes sorológicos de princípios diferentes devem ser reagentes. Os mais recomendados são Imunofluorescência Indireta (IFI), a Hemoaglutinação (HE) e o ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática). Quando o resultado de um exame é reagente e o outro não, o resultado é inconclusivo, no caso de amostras inconclusivas, pode-se utilizar outras técnicas com maior especificidade como o Western-blot (WB)(50). Os métodos parasitológicos indiretos como xenodiagnóstico (XD) e hemocultura podem ser utilizados para o isolamento e identificação de *T. cruzi*, mas possuem baixa sensibilidade, que pode ser melhorada com a repetição (51)(52).

São considerados portadores da fase crônica indeterminada (FCI) da doença de Chagas os indivíduos em fase crônica com sorologia reagente e/ou exame parasitológico positivo para *T. cruzi* que não apresentam sintomas clínicos específicos da doença, e com resultados de ECG (Ecocardiograma) convencional, estudo radiológico de tórax, esôfago e cólon normais (41)(48).

O diagnóstico diferencial na fase aguda deve ser de doenças como malária, arboviroses, leishmaniose visceral, hantavirose, toxoplasmose, febre tifóide, mononucleose infecciosa, esquistossomose mansônica aguda, leptospirose, miocardites virais. As formas congênitas devem ser diferenciadas daquelas causadas pelas infecções STORCH (sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovirose e herpes). A miocardite crônica e os megas devem ser diferenciadas das causadas por outras etiologias(41).

Entretanto, a maior parte das pessoas que contraem a DC não têm acesso a um diagnóstico específico e por consequência ficam sem tratamento, isto resulta no elevado impacto de morbimortalidade e o custo social da enfermidade. Para um diagnóstico confirmatório de DC o paciente necessita realizar mais de um exame dependendo da forma clínica que ele esteja manifestando (53).

1.7.1 Exames Parasitológicos

Para esses métodos a visualização do parasito é feita por meio de microscopia óptica (41).

A concentração, Strout, micro-hematócrito e creme leucocitário utilizam centrifugação do sangue e a pesquisa do parasito é feita na camada leucocitária formada na interface entre o sedimento dos eritrócitos e o plasma. São recomendados como 1ª escolha de diagnóstico em casos sintomáticos com mais de 30 dias de evolução.

A gota espessa (GE) é muito utilizada integrada às ações de diagnóstico da malária e considerada pela Organização Mundial da Saúde como o diagnóstico padrão ouro. É realizada uma coloração com azul de metileno e Giemsa para visualização da morfologia do parasita no sangue periférico.

A hemocultura é a técnica de grande valor diagnóstico para DC quando positiva, particularmente quando as provas sorológicas são inconclusivas, em pacientes imunodeprimidos e no controle pós-terapêutico. Porém, a limitação é o tempo prolongado para o resultado do exame. Se semeia sangue periférico em um meio de cultura específico para o crescimento do protozoário *T. cruzi*; observa-se o crescimento por meio de microscópio invertido. Pode alcançar 0% a 94% de positividade, alguns aspectos podem melhorar a sensibilidade como: o uso do meio Liver Infusion Tryptose (LIT), aumentar o volume do sangue semeado para 30 mL, repetir o exame, reduzir do intervalo de tempo entre a colheita e a inoculação, bem como aumentar o tempo de observação (54).

O xenodiagnóstico - XD é um método parasitológico indireto, usado no diagnóstico da DC, sobretudo na fase crônica, quando os parasitas circulantes

são escassos no sangue de indivíduos sorologicamente positivos. Proposto por Brumpt em 1914, consiste em colocar no braço do paciente uma quantidade definida de ninfas de 3º ou 4º estágio de espécies de triatomíneos, para se alimentarem do sangue do paciente; posteriormente se realiza a visualização das fezes dessas ninfas em microscópio óptico, com 30, 40 e 60 dias após o repasto, podendo chegar até 90 dias (55)(56). A positividade está entre 9 a 87,5%, podendo aumentar essa sensibilidade se realizado repetidas vezes com triatomíneos da mesma região geográfica do paciente e com uma quantidade grande de ninfas (51).

A xenocultura é um método empregado semeando-se fezes do barbeiro utilizado no exame XD, em meio LIT. Essa técnica facilita o isolamento de cepas de *T. cruzi* e controla a qualidade dos XD realizados (57).

A PCR (Reação em cadeia da polimerase) é utilizada principalmente na pesquisa para o isolamento do parasita, e tem demonstrando elevada sensibilidade na detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras de pacientes com DC aguda ou crônica, ou em fragmentos dos últimos segmentos abdominais de triatomíneos utilizados no XD. A sensibilidade dessa técnica é de 96,5% a 100%. (26)(51).

1.8 Tratamento

O tratamento específico da doença de Chagas deve ser realizado o mais rápido possível em pacientes com diagnóstico confirmado laboratorialmente. A eficácia do tratamento na forma aguda da doença está acima de 60%, em congênitos mais de 95% e em crônicos recentes (indivíduos que consegue confirmar que a forma aguda ocorreu há até 12 anos atrás) de 50% a 60% (57).

A droga de escolha disponível no Brasil é o benznidazol (Rochagan®) (comp. 100mg para adultos e 12,5mg para criança menores de 2 anos), que deve ser utilizado na dose de 5mg/kg/dia (adultos) e 10mg/kg/dia (crianças), divididos em 2 ou 3 tomadas diárias, durante 60 dias (57). O nifurtimox é um medicamento alternativo em casos de intolerância ao benznidazol e deve ser solicitado ao

grupo técnico de doença de Chagas da Diretoria de Vigilância Epidemiológica (GT Chagas/DIVEP) para que ele articule com o grupo técnico de doença de Chagas do Ministério da Saúde (GT-Chagas/MS) a liberação dessa medicação (53)(58).

Em indivíduos na fase crônica da doença com manifestações cardíacas graves não é recomendado o tratamento antiparasitário, pois não há evidências de benefícios clínicos na evolução deste paciente (57). As alterações cardiológicas são tratadas com as mesmas drogas usada em cardiopatias (cardiotônicos, diuréticos, antiarrítmicos, vasodilatadores, etc). Nas formas digestivas, pode ser indicado tratamento conservador (dietas, laxativos, lavagens) ou cirúrgico, dependendo do estágio da doença (41).

Em gestantes, devido a toxicidade dos efeitos colaterais, o tratamento antiparasitário é contraindicado (42)(59). Os efeitos adversos do nifurtimox são semelhantes aos verificados com o benznidazol, exceto menor tolerância digestiva, refletida na anorexia com perda de peso, náuseas e distúrbios psíquicos (42)(58).

1.9 Aspectos epidemiológicos

Originária da América Latina, exceto nas ilhas caribenhas, nas últimas décadas, a DC, tem sido dispersada amplamente (60)(61); detectada nos Estados Unidos da América, Canadá, países europeus e em alguns países do Pacífico Ocidental. Isso se deve principalmente à mobilidade populacional entre a América Latina e o resto do mundo (Figura 3).

A OMS (60), estima que 6 a 7 milhões de indivíduos estão infectados com *T. cruzi*, e mais de 25 milhões sob risco de infecção; causa mais de 10.000 mortes por ano sendo uma doença que sem tratamento antiparasitário específico ou bem sucedido pode levar a pessoa à deficiências ao longo da vida (61).

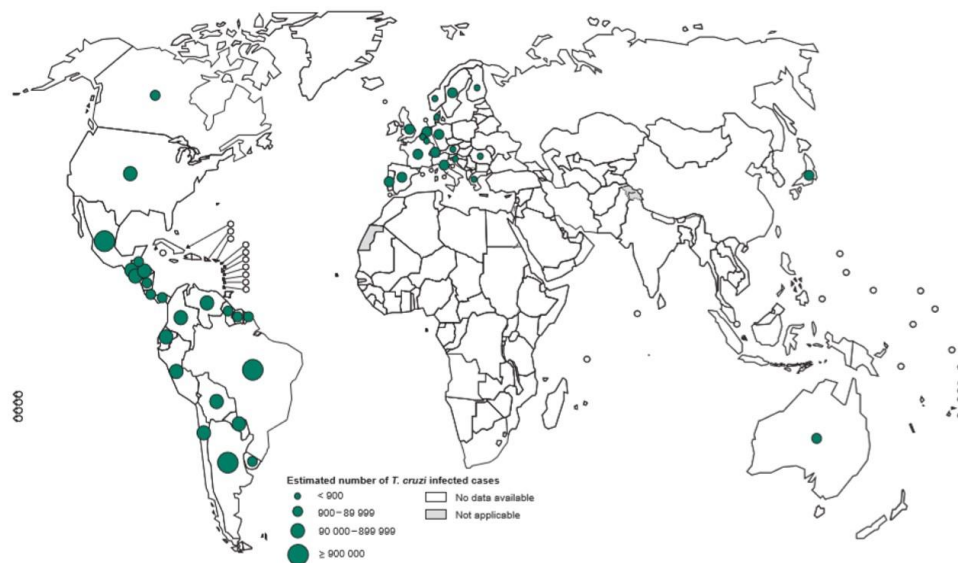


Figura 3: Distribuição de casos de doença de Chagas relatados à OMS, em todo o mundo, 2010-2013. Fonte: WHO, 2017.

Nas áreas endêmicas por muitas décadas, a DC foi estritamente rural, sendo sua ocorrência dependente basicamente da distribuição dos vetores domiciliados. A maioria dos chagásicos eram contaminados pelas fezes dos triatomíneos infectados. O afastamento dos insetos das moradias era o enfoque principal, visto que não existe medicamento preventivo. Assim, o modo de se impedir o aparecimento de novos casos deve ser feito, especialmente, através do controle dos principais mecanismos de transmissão (vetorial, transfusional, congênita e, atualmente, oral) do protozoário *T. cruzi* (62).

As ações de controle da transmissão vetorial da DC no Brasil começaram a se esboçar a partir da década de 1940, objetivando diminuir a transmissão da doença no ambiente domiciliar. O Programa de Controle da DC foi institucionalizado em 1950 pelo Serviço Nacional de Malária, até o ano de 1968, dados acumulados mostram terem sido realizados inquéritos entomológicos em 1.760 municípios do país, dos quais em 1.238 se verificou a existência de triatomíneos domiciliados e em 1.096 destes, a presença de exemplares

infectados por *T.cruzi*, mas só foi sistematizado e estruturado na forma de programa de alcance nacional em 1975 (63).

Em 2005, foi proposta uma metodologia de avaliação de risco de transmissão vetorial, e 16 estados foram avaliados. Foram analisados em alguns municípios critérios de infestação, indicadores ambientais e sócio-econômicos e após esta avaliação receberam uma classificação de baixo, médio e alto risco de transmissão vetorial. Em 2006, as ações de rotina do programa foram implementadas devido à presença do vetor em diversos municípios (64).

A partir deste programa de controle, no ano de 2006 o Brasil recebeu da Organização Pan-Americana o certificado de estar livre da transmissão vetorial pela espécie *Triatoma infestans*, principal vetor nas regiões endêmicas do Brasil. Mesmo com programas de controle a prevalência da DC no Brasil varia de 1,0 a 2,4% da população, o equivalente a 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* que resulta na elevada carga de mortalidade por DC no país, representando uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias (65).

Dados do Ministério da Saúde (MS) mostram que nos últimos anos, a dinâmica de transmissão desta doença vem se modificando, em 69% dos casos a principal forma provável de transmissão é a oral, a transmissão vetorial caiu para 9% e em 21% não foi identificada a forma de transmissão (65). Isto pode estar relacionado com as mudanças socioeconômicas, o êxodo rural, o desmatamento e a urbanização, que transformaram o perfil epidemiológico da doença, tornando-a um fenômeno mais urbano / peri-urbano (4).

1.9.1 Aspectos epidemiológicos na identificação de um surto

Um surto é definido quando há dois ou mais casos do que o esperado de uma doença em uma área específica entre um grupo de pessoas, ao mesmo tempo e causada por uma fonte comum. Pode ser identificado pela análise de rotina de dados da Vigilância epidemiológica a partir da notificação compulsória ou até mesmo por profissionais de saúde atentos, que percebem uma elevação

do número de casos em sua rotina, neste caso é provável que o surto esteja ocorrendo. O termo epidemia é utilizado geralmente em situações em que a doença envolve grande número de pessoas e atinge uma larga área geográfica, enquanto, uma doença para ser endêmica deve acontecer com muita frequência em um local, independentemente da quantidade (66).

Considera-se doença emergente aquelas que surgem com impacto significativo sobre o ser humano, cuja incidência aumenta em um dado lugar ou entre uma população específica. É um evento que apresenta risco de propagação ou disseminação para diferentes locais. São doenças de notificação compulsória e podem apresentar padrões epidemiológicos diferentes do habitual (67). A DC por transmissão oral na Amazônia é considerada uma doença emergente, e algumas regiões da Amazônia brasileira estão sendo reconhecidas como endêmicas para essa doença, devido à alta ocorrência de casos e/ou surtos (68)(43).

A investigação de um surto tem como objetivo à necessidade de interromper a fonte de transmissão e eliminar o risco de disseminação da doença para outras pessoas, além de estabelecer medidas de controle e prevenção de futuros surtos e eventos. O episódio é uma oportunidade de conhecer novos comportamentos de velhos patógenos, podendo, a partir disso, promover treinamentos, realizações de controle sanitário e ações de educação em saúde (66).

1.10 Histórico sobre os surtos por transmissão oral da DCA nas Américas

A DC aguda (DCA) por transmissão oral tem emergido como a principal forma de transmissão, em várias regiões da América Latina onde não há a domiciliação de vetores ou onde o controle intra e peridomiciliar de triatomíneos tem sido eficaz (41).

Na Venezuela ocorreu um surto associado ao consumo do suco de goiaba (69)(70), na Bolívia associado a um fruto de palmeira, parecido com o açaí, de nome regional majo (71) e na Colômbia associado ao suco de laranja (72).

No Brasil o primeiro registro de surto por transmissão oral ocorreu em 1968, e a fonte de contaminação foi a refeição em comum de 17 estudantes e trabalhadores de uma escola rural em Teutônia-RS. A partir de então, outros surtos foram relatados em outras regiões do Brasil (5), associados, principalmente, ao consumo de caldo de cana (73)(74), e ao açaí (75)(76)(77).

O MS registrou 112 surtos no período de 2005 a 2013 no Brasil. A maioria ocorreu nos estados do Pará, 75,9% e Amapá, 12,5% e, em menor proporção, nos estados do Amazonas, 4,5% Tocantins, 1,8% e Bahia, 1,8% (43).

1.10.1 Doença de Chagas na Amazônia

A Amazônia foi considerada por muitos anos uma região sem registros de DC embora por muito tempo houvesse um potencial risco, devido a presença do *T. cruzi*, em animais silvestres e a ocorrência de diversas espécies de triatomíneos vetores, descrita desde o início dos anos 1900 (78)(68).

Os primeiros casos agudos da DC em humanos foram relatados na década de 1940 na Guiana Francesa (79). Entretanto, na Amazônia Brasileira, os primeiros casos humanos autóctones da DC foram registados em 1969 em Belém-Pará. Em virtude dos casos terem sido detectados no mesmo período e na mesma residência, com ausência de triatomíneos domiciliares, houve suspeita de transmissão diferente da eventual, tendo como pela primeira vez, nesta região a hipótese de infecção oral, a partir da contaminação alimentar com fezes de barbeiro infectado (80).

Nessa região não ocorre a forma de transmissão tradicional da DC na e por ser uma doença com sintomatologia inespecífica, semelhante a outras infecções. Em situações normais ou de emergência no atendimento, dificilmente se pensa primeiramente em DC.

1.10.2 Doença de Chagas no Amazonas

No Amazonas, o primeiro relato de DC foi realizado em 1977, quando Ferraroni et al., relataram seis casos humanos, com exames sorológicos positivos para a DC crônica, na região de Barcelos (Alto Rio Negro) (81). Anos depois aquela região ficou conhecida como área de transmissão vetorial, pelo fato de que populações extrativistas da fibra da piaçaba viviam em contato constante com o *Rhodnius brethesi* (82).

Embora desde 1919 tenha-se registrado a ocorrência de *Rhodnius brethesi* no estado do Amazonas (83), o primeiro relato da DCA autóctone desse estado, ocorreu em 1980, procedente do município São Paulo de Olivença no extremo da Amazônia ocidental (84). E o primeiro surto da DC aguda com relato de transmissão oral, pelo consumo do açaí, ocorreu em 2004, no município de Tefé. Desde então, até o ano de 2018, seis surtos de DC foram registrados, todos relacionados a transmissão oral, sendo a ingestão do suco do açaí o principal aspecto em comum entre os pacientes (4)(76)(77)(27)(85).

1.10.2.1 Açaí

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma espécie nativa da Região Amazônica, que pertence à família Arecaceae, encontrada nas várzeas de estuário muito importante socioeconômicamente. O Brasil é considerado o país que mais produz, consome e exporta o açaí, e as indústrias, visando a manutenção e ampliação do mercado do fruto, estão investindo não só no cultivo, mas também na qualificação da mão de obra (86).

O Estado do Pará, é o maior produtor do frutos e o principal consumidor do suco conhecido pela população por "vinho de açaí". A polpa de seu fruto apresenta rico valor nutricional e constitui-se em uma das bases alimentares da dieta das populações da Amazônia. Nos últimos anos, em razão de ser um alimento de apelo ecológico combinado com sua característica energética, motivo pelo qual esportistas tem grande interesse, o consumo pelo açaí tem crescido, principalmente a exportação (86). Com o crescimento do mercado,

esse produto passou a ser consumido também nas grandes capitais brasileiras, atingindo alguns países, como Japão, China, Estados Unidos e Europa (87).

1.10.2.2 Relevância do estudo

A infecção chagásica é uma doença negligenciada que tem se expandido para além das fronteiras sul americanas. Na Amazônia um novo cenário tem sido observado referente a principal forma de transmissão, a oral, demandando atenção dos serviços de atendimento à população. Nesse contexto torna-se de grande relevância os estudos que apresentem informações sobre os eventos ocorridos nesta região, visando o registro das características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos pacientes acometidos, para melhoria das ações de vigilância e realização serviços.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Descrever aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais observados nos pacientes envolvidos nos surtos da doença de Chagas no estado do Amazonas.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever a distribuição espacial e temporal dos surtos;
- Descrever características clínico-epidemiológicas da população envolvida nos surtos ocorridos no estado do Amazonas;
- Listar e descrever os tipos de exames parasitológicos realizados;
- Identificar os genótipos dos isolados de *T. cruzi* das populações envolvidas nos surtos.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

Surtos da doença de Chagas aguda no estado do Amazonas: o consumo do açaí como uma fonte comum de transmissão

Débora Raysa T. de Sousa¹, Jorge Augusto O. Guerra^{2,3}, Rosa A.G. Santana², Laylah K. Magalhães¹, Nelson F. Fé², Igor C. Tavares³, Romulo F. Moraes², Jessica V. Ortiz¹, George A.V. Silva⁴, Vinicius S. Monteiro², Rubens C. Andrade¹, Ana Ruth L. Arcanjo⁵, Arineia S. Silva¹, Kátia Couceiro¹, Karla Petrucelli¹, João Marcos B. B. Ferreira^{1,6}, Henrique Silveira⁷, Maria das Graças V.B. Guerra^{1,2}.

¹ Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil

² Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brasil

³ Faculdade Metropolitana de Manaus, FAMETRO, Manaus, Brasil

⁴ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil

⁵ Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, FVS-AM

⁶ Hospital Francisca Mendes, Manaus, Brasil

⁷ Instituto de Higiene e Medicina Tropical/Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

Resumo

A doença de Chagas-DC é uma enfermidade que se manifesta clinicamente no homem, numa fase aguda e outra crônica, após o contato com o *Trypanosoma cruzi*. Na Amazônia a forma aguda tem sido cada vez mais frequente registrada principalmente em surtos, ligados a alimentos contaminados. Este trabalho tem como objetivo conhecer e descrever aspectos epidemiológicos e clínicos dos surtos da DC por transmissão oral, ocorridos no estado do Amazonas. Os dados foram obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação-SINAN e prontuários dos pacientes atendidos no ambulatório de DC da Fundação Dr. Heitor Vieira Dourado de Medicina Tropical-FMTHVD. Entre 2004-2018

ocorreram 6 surtos em 5 municípios (Tefé-2004, Coari-2007, Santa Isabel do Rio Negro-2010, Carauri-2011-2015 e Lábrea-2018). Todos os pacientes tinham em comum a mesma história epidemiológica, o consumo de açaí e 106 pessoas foram afetadas, a maioria, 60 (57%) do sexo masculino; a faixa etária variou entre 8 meses à 82 anos. Em todas as situações, foram acometidos, mais de um membro da mesma família ou parentes próximos, bem como amigos ou vizinhos. Foram relatados sintomas inespecíficos, a síndrome febril em 99% dos pacientes, astenia em 65%, mialgia 53% e cefaléia 51%. A meningoencefalite foi observada em dois pacientes e alterações cardíacas em 24 (44%) de 54 observados. O diagnóstico inicial foi a gota espessa, realizada em 92 (87%) dos pacientes e 91 (86%) positivaram; também foram realizados a hemocultura, xenodiagnóstico, xenocultura e PCR; do total, 9,4% eram assintomáticos e foram diagnosticados por exames sorológicos. As linhagens de *T. cruzi* Z3 (TcIII/TcIV) e TcIV foram identificadas. Observa-se a necessidade de intensificação de ações que orientem à população para a vulnerabilidade à infecção, uma vez que nessas circunstâncias, ocorre exposição simultânea à mesma fonte de transmissão no mesmo tempo e espaço.

Introdução

Após mais de 100 anos da sua descoberta a doença de Chagas (DC) permanece como uma importante parasitose, uma vez que 6-7 milhões de pessoas, estão infectadas, principalmente na América Lantina. Nos últimos anos, a mobilização e a migração da população expandiu a doença para diversos países além das fronteira sul americanas (1) definindo-a como um problema emergente de saúde pública global (2)(3).

É uma enfermidade causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário que realiza seu de ciclo de vida complexo em diferentes espécies de hospedeiros mamíferos (Marsupiais, Chiroptera, Rodentia, Edentata, primatas nativos) como hospedeiros reservatórios (incluindo o homem) (4) e invertebrados, insetos domésticos e silvestres da ordem Hemiptera, Família Reduviidae e subfamília Triatominae (5)(6).

Por ser um parasita eclético, o *T. cruzi* é classificado geneticamente em sete Unidades discretas de tipagem (DTUs) (TcI-TcVI e Tcbat) (7), e a doença apresenta duas fases clínicas (aguda e crônica). Durante a fase aguda, um grande número de parasitas circula no sangue, mas na maioria dos casos os sintomas estão ausentes ou são leves e inespecíficos. Durante a fase crônica, os parasitas ficam alojados principalmente em tecido cardíaco e tecido conjuntivo digestivo (8).

Na América Latina, o *T. cruzi* é transmitido principalmente pelo contato com fezes/urina de triatomíneos, infectados, podendo também ser transmitido por transfusão de sangue ou transplantes de órgãos, de forma congênita (durante a gravidez ou parto), acidentes laboratoriais e consumo de alimentos contaminados (8), sendo a via oral um caráter habitual no ciclo enzoótico primitivo do *T. cruzi*, através da ingestão, realizado por mamíferos ao se alimentar de vetores ou reservatórios infectados (9).

Na Amazônia brasileira, o ciclo de *T. cruzi* em primatas não humanos e a ocorrência de espécies de triatomíneos é conhecida desde o início do século XX (10). Nessa região o primeiro relato de casos autóctones da DC no homem, ocorreu em 1969, em Belém-Pará, com suspeita de transmissão oral (11). Desde então, a transmissão oral tem sido responsável por microepidemias regionais da DC aguda (12), tendo uma fonte comum de transmissão, sucos de frutas de palmeiras principalmente o açaí (*Euterpe olerace*), que é amplamente consumido pela população. Nos últimos anos o número de surtos por transmissão oral tem aumentado progressivamente, se tornando motivo de preocupação pelas agências de saúde (12)(13), evidenciando a necessidade de ações preventivas.

No estado do Amazonas, o primeiro registro da doença ocorreu em 1977, quando foram detectados casos suspeitos de DC crônica por meio de sorologia reativa (14), e o primeiro caso autóctone agudo foi registrado em 1980 no município de São Paulo de Olivença. O primeiro surto da DC aguda foi registrado em 2004 (15), e ao longo dos anos, houve um aumento no número de surtos de doença aguda (13), todos relacionados à transmissão oral, bem como de casos isolados

cuja forma de transmissão é desconhecida (16)(17). Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo conhecer e descrever os aspectos peculiares dos surtos da doença de Chagas por transmissão oral ocorridos no estado do Amazonas.

Casuística e Métodos

As informações relacionadas aos surtos de DCA por transmissão oral no estado do Amazonas foram obtidas do Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN e dos prontuários dos pacientes atendidos no ambulatório de doença de Chagas da Fundação Dr. Heitor Vieira Dourado de Medicina Tropical (FMTHVD). Foram incluídas pessoas com resultados positivos para gota espessa ou sorologia IgM que tinham em comum a mesma história epidemiológica de ter consumido o açaí, nos surtos ocorridos no período de 2004 a 2018. Sobre os pacientes, foram coletados dados sobre o local de origem, idade, sexo, data da notificação, sintomas, resultados parasitológicos, sorológicos, tratamento, efeitos adversos da droga e linhagem do *T. cruzi* detectado a partir da Reação em cadeia da Polimerase (PCR).

As sorologias foram realizadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas (LACEN). As informações sobre resultados da hemocultura, xenodiagnóstico e PCR foram obtidas dos pacientes atendidos em Manaus, procedimentos esses realizados no laboratório de entomologia do FMTHVD, com exceção da PCR de amostras de pacientes do primeiro surto que foi realizado pelo laboratório da FIOCRUZ/RJ pelo grupo do Dr. José Rodrigues Coura. A partir do segundo surto, a extração de DNA foi realizada utilizando material de cultura de sangue seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do PureLink Kit (Invitrogen, Life Technologies, EUA). O DNA extraído foi submetido à análise do gene da glicose-fosfato isomerase (GPI) (18). O produto da PCR foi purificado como descrito em outros artigos anteriormente (19)(20).

O sequenciamento foi realizado no ABI 3130 DNA sequencer (Applied Biosystems, <https://www.thermofisher.com>) seguindo o protocolo do kit Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), utilizando 10-40ng

do produto da PCR purificado e o primer usado na PCR. As sequências obtidas foram montadas e alinhadas com as sequências padrões obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando as seguintes cepas padrão: TcI (Silvio X10 cl4), TcII (Esmeraldo cl3), TcIII (M6241 cl6), TcIV (CANIII cl1), TcV (Mn cl2) e TcVI (CL Brener) (21). Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança foram inferidas usando o W-IQ-TREE (22).

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa Stata/MP 13,0. Foi utilizado o teste qui-quadrado para comparação de frequências e os dados estão apresentados em tabelas, com as frequências absolutas e relativas. Assumiu-se um intervalo de confiança de 95% (IC95%, $p < 0,05$) para todos os testes estatísticos.

Considerações Éticas

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical com o número CAAE:03164118.9.0000.0005.

Resultados

Descrição geral

No estado do Amazonas, entre 2004 e 2018, ocorreram 6 surtos de DCA em municípios localizados em diferentes mesoregiões, dois localizados no centro amazonense (Tefé e Coari) e um município em cada uma das outras regiões, norte amazonense (Santa Isabel do Rio Negro), sul (Lábrea) e sudeste (Carauari), todos estes municípios estão localizados em uma linha vertical no centro do estado e 106 pessoas foram incluídas nestes surtos (Figura 1). Em todos os surtos o caso índice foi detectado pelo serviço de malária através do teste da gota espessa e após o diagnóstico inicial, as investigações epidemiológicas foram realizadas por uma equipe composta por funcionários da FVS, FMTHVD e MS.

O primeiro surto ocorreu em 2004, em Tefé, com 9 casos (8,4%) e o mais recente, em Lábrea, diagnosticado no final de dezembro de 2017 e janeiro de 2018, com 20 casos (18,9%); o intervalo de tempo entre um surto e outro variou de 1 a 4 anos, com uma média de 2,6 anos, entre os meses de dezembro a junho, em todas as situações, mais de um membro da mesma família ou parentes próximos, além de amigos ou vizinhos, foram afetados, e todos tiveram relato de beber suco de açaí (Tabela 1).

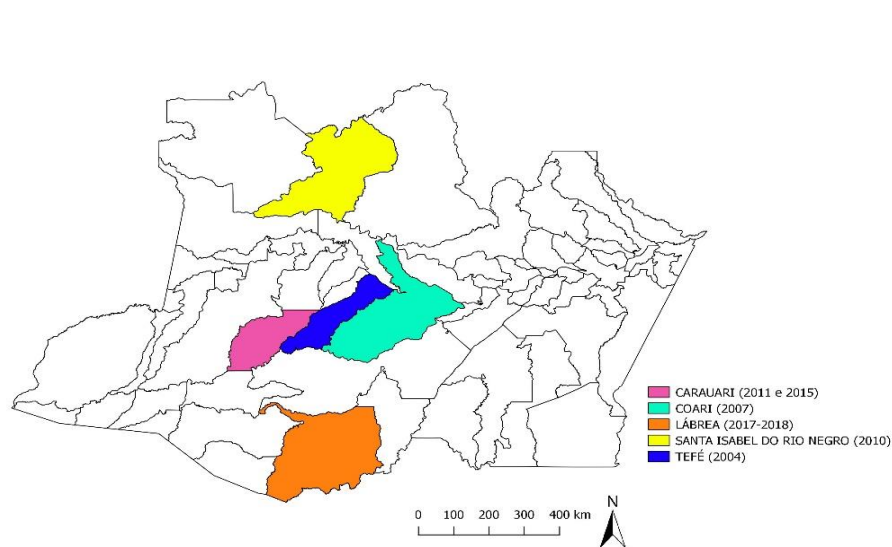


Figura 1: Mapa do Amazonas com os municípios onde ocorreram os surtos e os respectivos anos. Fonte: Andrade, R. 2019.

De 106 pacientes, 60 (57%) foram do sexo masculino, na maioria dos surtos os homens foram mais acometidos, exceto em Lábrea com 17 (85%) mulheres, a idade variou em todos os surtos acometendo pessoas de todas as faixas etárias, desde 8 meses até 82 anos (Tabela 1).

Os sinais e sintomas foram registrados em 94/106 (88,6%) pacientes; Não há registros de sintomas de dois pacientes de Carauari 2015 . A apresentação inicial dos sintomas ocorreu no período de 2 a 21 dias após a data provável de infecção (data que tomaram o suco do açaí); a síndrome febril de início súbito e prolongada, foi o sintoma mais frequente, registrado em 93 (99%), geralmente acompanhada de outros sintomas inespecíficos; dois pacientes, apresentaram um quadro de meningoencefalite - uma paciente do surto de Tefé, sexo feminino,

16 anos (23) e um paciente, sexo masculino, 10 meses, do primeiro surto de Caruari, neste paciente foi possível detectar *T. cruzi* no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Tabela 2).

Tabela 1 - Características gerais dos pacientes dos surtos de doença de Chagas no Amazonas.

Variáveis	Total (n=106)	Tefé (n=9)	Coari (n=26)	SIRN (n=17)	Carauari (n=15)	Carauari II (n=19)	Lábrea (n=20)	p-valor
Mês/Ano	---	Jun/2004	Apr/2007	Jan/2010	Jan/2011	Jan/2015	Jan/2018	
Idade								
0-2	3 (3)	-	-	-	2 (13,3)	-	1 (5)	
3-10	6 (6)	-	3 (11,5)	1 (5,9)	1 (6,7)	-	1 (5)	
11-18	18 (17)	2 (22,3)	5 (19,2)	1 (5,9)	3 (20)	3 (15,8)	4 (20)	
19-34	45 (42)	5 (55,5)	9 (34,6)	11 (64,7)	3 (20)	7 (36,8)	10 (50)	
35-59	20 (19)	-	5 (19,2)	3 (17,6)	5 (33,3)	5 (26,3)	2 (10)	
≥ 60	14 (13)	2 (22,3)	4 (15,4)	1 (5,9)	1 (6,7)	4 (21)	2 (10)	
Gênero								<0.001
Feminino	46 (43)	5 (55,6)	8 (31)	2 (11,8)	6 (40)	8 (42)	17 (85)	
Masculino	60 (57)	4 (44,4)	18 (69)	15 (88,2)	9 (60)	11 (58)	3 (15)	
Sintomáticos	94 (88,6)	9 (100)	26 (100)	17 (100)	15 (100)	17* (89)	10 (50)	<0.001

Os dados são expressos como números absolutos, entre parênteses estão a porcentagem do grupo total. (*) = não há registro de todos os pacientes.

Tabela 2: Descrição dos sinais e sintomas relatado pelos 94 pacientes durante os seis surtos de DAC ocorridos no estado do Amazonas.

Classificação	Sinais e Sintomas	Nº de casos (n=94)	%
Sintoma Geral	Síndrome febril	93	99
	Astenia	61	64,9
	Mialgia	50	53,2
	Cefaléia	41	43,6
	Artralgia	36	38,3
	Hiporexia	27	28,7
	Prostração	12	12,7
	Calafrios	12	12,7
	Linfadenomegalia	10	10,6
	Tontura	8	8,5
	Dispneia	5	5,3
Digestivo	Náuseas	30	31,9
	Vômito	20	21,3
	Dor epigástrica	15	15,9
	Hepatomegalia	11	11,7
	Esplenomegalia	11	11,7
	Icterícia	10	10,6
	Colúria	4	4,2
	Diarreia	3	3,2
Dermatológico	Dor abdominal	3	3,2
	Edema de face e MII	15	15,9
	Edema de face	6	6,4
	Edema de MII	2	2,1
	Edema*	8	8,5
	Rash cutâneo	16	17
Cardíaco	Eritema	6	6,3
	Palpitação	13	13,8
	Dor precordial	7	7,4

Dados apresentados como número absoluto e frequência relativa. () = sem registro do local do edema. Obs: Não há registro de sintomas de dois pacientes; Houve 10 pessoas assintomáticas.*

Diagnóstico - Dados sobre os Exames laboratoriais realizados

Exames parasitológicos – dos 106 registros, o diagnóstico confirmatório foi dado por exames parasitológicos em 92 (87%) dos pacientes: a gota espessa foi o exame que diagnosticou 91 (86%) dos casos. Entre os exames parasitológicos complementares, encontrou-se registro de positividade na hemocultura 65/67 (97%); xenodiagnóstico 55/60 (91,6%); xenocultura 18/35 (54%) e PCR 67/67 (100%). O exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) foi realizado em dois pacientes e encontrou-se positividade em apenas um.

Linhagem de *T. cruzi* – há registro de *T. cruzi* Zimodema-3 nos pacientes de Tefé ocorrido em 2004, época em que não havia a classificação atual de DTUs e que hoje equivale a (TcIII/TcIV); e TcIV nos demais surtos (Tabela 3).

Exames sorológicos- foram encontrados dados sobre amostras de pacientes submetidas ao ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) IgG; teste de imunofluorescência indireta (IFI) (IgM e IgG); e teste de hemaglutinação indireta (HAI) IgG. Os teste mais realizado foram a HAI, 81 (76,4%) e o ELISA, 77 (72,6%); e o que mais apresentou resultados reagentes foi a IFI (IgM), 34 (62%) das vezes, porém demonstrou 21 (38%) resultados indeterminados (Tabela 3).

Exames cardiológicos- foram encontrados registros de exames cardiológicos de 54 (51%) pacientes, sendo observadas alterações cardíacas em 24 (44,4%). Encontrou-se registro de 52 pacientes que realizaram o eletrocardiograma (ECG) antes do tratamento, e destes, 22/52 (42,3%) pacientes apresentaram alterações cardíacas; o ecocardiograma foi realizado em 23 pacientes, com alteração em 3 (13%); um paciente que apresentou alteração cardíaca no ecocardiograma, também apresentou alteração no eletrocardiograma. A alteração de repolarização ventricular foi o achado mais comum em 6 (27,3%) pacientes (tabela 4).

Tabela 3: Descrição dos exames laboratoriais realizados nos pacientes dos surtos.

Variável	Total (n=106)	Tefé (n=9)	Coari (n=26)	SIRN (n=17)	Carauari (n=15)	Carauari II (n=19)	Lábrea (n=20)
Exames parasitológicos							
GE	106 (100)	9 (8,5)	26 (24,5)	17 (16)	15 (14)	19 (18)	20 (19)
Positivo	91 (86)	9 (100)	25 (96)	17 (100)	15 (100)	16 (84,2)*	9 (45)
Hemocultura	67 (63)	9 (13,4)	23 (34)	10 (15)	11(16,4)	6 (8,9)	7 (10,4)
Positivo	65 (97)	9 (100)	23 (100)	10 (100)	11 (100)	6 (100)	6 (86)
Xenodiagnóstico	60 (56,6)	9 (15)	24 (40)	14 (23)	-	6 (10)	7 (11,6)
Positivo	55 (91,6)	9 (100)	19 (79)	14 (100)	-	6 (100)	7 (100)
Xenocultura	35 (33)	9 (25,7)	14 (40)	-	-	6 (17)	6 (17)
Positivo	18 (51,4)	8 (88,9)	8 (57)	-	-	1 (16)	0
LCR	2 (1,8)	1 (50)	-	-	1(50)	-	-
Positivo	1 (50)	0	-	-	1 (100)	-	-
PCR	67 (63)	9 (13,4)	19 (28,3)	14 (21)	11 (16,4)	6 (9)	8 (11,9)
Positivo	67 (100)	9 (100)	19 (100)	14 (100)	11 (100)	6 (100)	8 (100)
Exames sorológicos*							
ELISA	77 (72,6)	-	26 (33,7)	17 (22)	11 (14)	9 (11)	14 (18)
Reagente	5 (6,4)	-	1 (1,2)	2 (2,4)	0	2 (2,4)	0
Indeterminado	5 (6,4)	-	1 (1,2)	2 (2,4)	1 (1,2)	1 (1,2)	0
IFI IgM	55 (51,8)	9 (16,5)	17 (31)	9 (16,5)	-	5 (9)	15 (27)
Reagente	34 (62)	9(100)	7 (41,2)	6 (66,6)	-	1 (20)	11 (73)
Indeterminado	21 (38)	0	10 (58,8)	3 (33,4)	-	4 (80)	4 (23,5)
IFI IgG	66 (62,2)	-	26 (39,3)	15 (22,7)	-	9 (13,6)	16 (24,2)
Reagente	29 (44)	-	4 (15)	11(73)	-	6 (67)	8 (50)

Indeterminado	1 (1,5)	-	0	0	-	0	1 (6,25)
HAI	81 (76,4)	9 (11)	26 (32)	17 (21)	11 (13,6)	9 (11)	9 (11)
Reagente	15 (18,5)	9 (100)	1 (4)	2 (11,7)	0	2 (22)	1 (11)
Indeterminado		0	0	0	0	0	0

Os dados são expressos como números absolutos, entre parênteses estão a porcentagem do grupo total. GE= Exame de gota espessa; LCR- líquido cefalorraquidiano; PCR - reação em cadeia da polimerase. ELISA: ensaio imunoenzimático; IFI (IgM e IgG) = teste de imunofluorescência indireta para imunoglobulina M e G. () = não há registro de resultados de alguns pacientes.*

Tratamento e efeitos adversos

Após a confirmação do diagnóstico todos os pacientes foram tratados com Benznidazol (Rochagan®), 5-7 mg/kg/dia (adultos) e 10 mg/kg/dia, por via oral (crianças) durante 60 dias, seguindo o que recomenda o II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas de 2015(8), imediatamente após a conclusão diagnóstica. Não há registros de seguimento clínico de todos os pacientes. Encontrou-se informações sobre efeitos adversos ao tratamento de 22 pacientes, e destes 16 (72,7%) apresentaram alguma sintomatologia associada ao medicamento, sendo prurido e rash cutâneo os mais referidos (Tabela 5).

Tabela 4: Descrição das alterações cardiológicas observadas nos paciente por surto.

Alterações Cardíacas	Total (n=24)	Tefé (n=3)	Coari (n=3)	SIRN (n=3)	Carauari (n=4)	Carauari II (n=4)	Lábrea (n=7)
Eletrocardiograma	22/52 (42,3)						
Alteração de repolarização ventricular	6 (27,3)	-	-	-	1	3	2
Alteração de repolarização ventricular + Taquicardia sinusal	1 (4,5)	-	-	-	-	-	1
Baixa voltagem do QRS	2 (9,0)	-	-	1	-	-	1
Bloqueio divisional anterossuperior (BDAS)	2 (9,0)	-	-	1	-	-	1
Bloqueio do ramo direito (BRD)	1 (4,5)	1	-	-	-	-	-
Bloqueio do ramo direito + bloqueio divisional anterossuperior	2 (9,0)	-	-	1	1	-	-
Distúrbio de condução do ramo direito (DCRD)	2 (9,0)	-	1	-	-	1	-
Extrassistole ventricular	1 (4,5)	-	1	-	-	-	-
Pré-excitação	1 (4,5)	-	-	-	-	-	1
Ritmo de galope	1 (4,5)	-	1	-	-	-	-
Taquicardia sinusal	3 (13,6)	-	-	-	2	-	1
Ecocardiograma	3/23 (13)						
Disfunção ventricular	1 (33,3)	-	1	-	-	-	-
Derrame pericárdico + área cardíaca aumentada	*2 (66,6)	2					

Os dados são expressos como números absolutos, entre parênteses estão a porcentagem do grupo total. QRS: Complexo de ondas do eletrocardiograma. (*)= Não há informações sobre o eletrocardiograma de dois pacientes que realizaram o ecocardiograma.

Tabela 5- Descrição dos efeitos adversos observados.

Efeitos adversos	Frequência* (n=16)	%
Prurido	8	50%
Rash cutâneo	8	50%
Descamação	5	31,2%
Queda de cabelo	3	18,7%
Astenia	3	18,7%
Mal estar	3	18,7%
Edema de face	1	6,2%

Dados apresentados como número absoluto e frequência relativa. ()= Um mesmo paciente pode apresentar mais de um efeito adversos.*

Discussão

A transmissão do *T. cruzi* via oral, pela ingestão de alimentos contaminados, tem sido um tema de discussões importantes, nos últimos anos, particularmente envolvendo a Amazônia (24)(25). Uma forma de transmissão do *T. cruzi* para o homem, considerada no passado, improvável, tem sido responsável pelos surtos relatados em vários países, tais como Venezuela (26)(27), Colômbia (28), Bolívia (29) e Brasil conforme revisão de Shikanai e Carvalho, 2012 (12), sendo a forma mais frequente nos estados da Amazônia, Pará (30)(31), Amapá (32) e Amazonas (16).

Nesse estudo relata-se pela primeira vez situações inerentes aos surtos da DC aguda ocorridos no estado do Amazonas. Observou-se semelhanças dos demais relatos, onde a detecção do caso índice foi realizada pelo serviço de malária através do teste de gota espessa, evidenciando a importância desse serviço para essa região, e ratificando a estratégia recomendada nas discussões sobre vigilância para DC na Amazônia, desde o início da década de 2000 (24) (25), implantada oficialmente a partir de 2008, com treinamentos seriados de microscopistas direcionados a áreas malarígenas(33).

No estado do Amazonas, as investigações epidemiológicas foram realizadas por uma equipe composta por funcionários da FVS e FMTHVD que trabalharam em colaboração em todas as situações junto com o MS, seguindo o fluxograma

proposto para vigilância da DC na Amazônia (34). Destaca-se que em todos os surtos a FMTHVD inseriu na sua equipe, profissionais médicos incluindo residentes, e técnicos de entomologia que juntos realizaram os inquéritos sorológicos e entomológicos. Nessas circunstâncias foram observadas e comprovadas as situações em que membros da mesma família que tomaram o açaí não manifestaram sintomas e/ou foram negativos na gota espessa.

O registro de dois surtos (4º e 5º), no mesmo município (Carauari), infere a necessidade de intensificação de vigilância e fiscalização dos produtores locais de açaí, quanto as normas de higienização, para que, após produção o suco a ser comercializado, uma vez que a forma de coleta, higienização, produção e distribuição do açaí é de responsabilidade de quem distribui, e portanto, não deve colocar em risco, a saúde dos consumidores (35).

Tradicionalmente na Amazônia, o processo de produção do açaí sempre ocorreu de forma pontual e artesanal (caseira) onde cada família produzia o suco a ser consumido, e não havia relatos de casos simultâneos (surtos). Atualmente, diante do crescimento da demanda pela polpa (36), o produto passou a ocupar lugar de destaque entre os consumidores no mercado nacional e internacional com produção industrial em grande escala e muitas vezes os produtores não seguem as medidas de higiene preconizadas, produzindo e distribuindo o suco para a população geral. O açaí é distribuído tanto na área rural quanto urbana, mudando assim o perfil de transmissão da doença que passou de caso isolado para vários casos registrados simultaneamente (16)(30)(37).

O relato de que em todas as situações haviam mais de um membro de uma mesma família ou de convivência próxima, como amigos ou vizinhos e todos relataram uma situação em comum que era o consumo do açaí, expressa a necessidade de acompanhamento dos envolvidos que sejam assintomáticos e/ou não diagnosticados, considerando a possibilidade de evolução para cronicidade da DC. Nos surtos relatados em outras regiões também foi observado convivência próxima, por exemplo, em ambientes de trabalho como na Paraíba, após uma reunião particular (38) e em uma escola na Venezuela (26) e no refeitório de um aeroporto na Colômbia (28). Entretanto, não há relatos na literatura sobre o seguimento de pessoas expostas sem diagnóstico.

A variação no número de casos por faixa etária com uma frequência de 8,5% em crianças até 10 anos (3% menores de 2 anos) e 13% de idosos acima de 60 anos, demonstra que nos surtos, todas as pessoas que consomem açaí podem estar vulneráveis e susceptíveis a infecção caso esse alimento esteja contaminado. Também demonstra a importância do açaí para a região uma vez que é consumido por pessoas de todas as idades, refletindo a realidade sobre o consumo de açaí na região, que é apreciado pela população independente de raça, condição social ou idade, por ser um alimento que faz parte da dieta alimentar, rico em vários nutrientes (36).

Nas áreas endêmicas a forma clássicas de transmissão da doença de Chagas, não ocorre de forma oral e sim vetorial uma vez que os vetores são domiciliados (39) no entanto a maior prevalências está relacionada a casos crônicos não podendo se inferir um período específico de infecção. Na Amazônia os surtos de DCA estão sempre associados ao consumo de açaí e ocorrem durante o período de safra de frutas locais, como no caso do Amazonas onde os surtos tem ocorrido nos meses de dezembro a junho, período também coincidente com a safra do açaí (36). No Pará, a maior frequência dos casos tem ocorrido no segundo semestre (40).

Aspectos clínicos

A apresentação clínica mais frequente foi a síndrome febril (99%), com início súbito e prolongado, o que coincide com o observado em outros estudos sobre a DCA no Pará (31), no Amazonas (17) e em regiões endêmicas em Minas Gerais (41).

A taxa de positividade elevada registrada nos diferentes métodos parasitológicos realizados, confirma o esperado, uma vez que a alta parasitemia é uma característica da fase aguda da DC, e certamente auxiliou no diagnóstico inicial, mas é importante destacar a eficiência do serviço de atendimento a malária na a detecção de casos.

No que diz respeito aos resultados do diagnóstico sorológico, observou-se variação na sensibilidade dos testes utilizados. Embora as metodologias

realizadas sejam as recomendadas pelo MS (42), foi observado resultados indeterminados nos exames de IFI IgM, mesmo com a gota espessa positiva. Segundo as diretrizes do MS, na fase aguda, a sorologia pode ser realizada como exame complementar e como diagnóstico de um caso suspeito quando exames parasitológicos estão negativos e a suspeita clínica persiste. Estudos anteriores realizados no Amazonas demonstraram a baixa sensibilidade destes testes, isto pode estar relacionado com a diversidade genética do parasito, visto que estes testes sorológicos disponíveis no mercado utilizam cepas diferentes das que circulam na região amazônica (43)(44).

Avaliação cardíaca e da linhagem

O alto número de pacientes com alteração cardíaca no ECG (42,3%), antes do tratamento, evidencia a importância desses exames nos envolvidos, uma vez que o percentual apresentado, representa 50% da população envolvida. A alteração de repolarização ventricular foi o evento mais comum, nos casos avaliados, e o detalhamento dessa casuística publicado recentemente por Ortiz et al, 2018 (45) com observação de que são manifestações também relatadas nos surtos ocorridos no estado do Pará (31).

Provavelmente o diagnóstico e tratamento precoce realizado e/ou a linhagem do *T. cruzi* TcIV circulante tenham evitado a gravidade e desfecho fatal de pacientes, pois nenhum óbito foi relatado em pacientes envolvidos nos surtos da DCA no estado do Amazonas, diferentemente de outros países da América Latina, como na Colômbia (28) e na Venezuela (46)(27) que há relatos de letalidade, assim como no Pará (31) e no Rio Grande do Norte (47).

As linhagens de *T. cruzi* circulantes, podem caracterizar a gravidade ou não da DC. No entanto, há poucos relatos quanto a descrição molecular de DTUs na região amazônica. A linhagem do *T. cruzi* isolada dos pacientes dos surtos ocorridos até o momento no Amazonas foi a TcIV, exceto no primeiro surto ocorrido em Tefé, onde os isolados foram caracterizados como Z3 (TcIII/TcIV), porque na época, ainda não havia a nomenclatura atual.

Segundo Monteiro et al, 2013 (48) a patogenicidade dos isolados amazônicos é baixa, e pode explicar a baixa mortalidade, sugerindo que nas regiões onde a

letalidade dos surtos é maior, talvez circule linhagens mais virulentas, com alto comprometimento cardíaco, provavelmente porque a linhagem encontrada seja TcII (49), que ainda não foi registrada no Amazonas, onde a linhagens TcI tem sido encontrada relacionada a casos agudos isolados e pacientes com DC crônica indeterminada e TcIV relacionada aos surtos (50)(51)(52).

Na Colômbia, também há registro de TcI e TcIV em isolados de um surto ocorrido em 2013 (53). Isso demonstra que a linhagem TcIV, uma cepa silvestre e pouco relatada em isolados humanos (54) se mostra muito envolvida em surtos por transmissão oral.

Em um estudo de infecção experimental, foi analisado a performance de invasão das células hospedeiras por infecção oral dos genótipos de *T. cruzi* TcI e TcIV e foi observado que, a capacidade diferencial das cepas de invadir o epitélio gástrico após a administração oral está associada à expressão diferencial de moléculas de superfície do parasito. Observou-se ainda que a capacidade de migração dos parasitos TcIV através do revestimento de gástrico foi maior que TcI, resultando em um melhor sucesso da linhagem TcIV em infecções orais (55). Isto pode estar relacionado ao motivo de até o momento a linhagem TcIV ser a responsável pelos surtos no Amazonas.

Discussão dos efeitos adversos – poucos foram os dados encontrados sobre pacientes que apresentaram efeitos adversos ao medicamento. Há informações, principalmente, dos pacientes do surto ocorrido recentemente em Lábrea. Dos 20 pacientes acometidos neste surto 14 (70%) apresentaram alguma reação, principalmente, dermatológicas. O protocolo clínico e diretrizes terapêuticas (42) cita que a frequência de efeitos adverso ao benznidazol é de 53% e que as reações dermatológicas são as mais comuns.

Em um estudo realizado no Ceará com pacientes crônicos observou-se que 87,5% dos tratados com o benznidazol apresentaram alguma reação adversa que na maioria das vezes era um sintoma dermatológico, como prurido (50%), rash cutâneo (31,3%) e descamação da pele (25%) (56). Diante das situações evidenciadas foram incluídos a administração de antialérgicos e corticoides

dependendo da necessidade. Quando necessário o tratamento foi interrompido até a melhora dos efeitos (8).

Este trabalho teve como intuito, unificar informações sobre todos os surtos, estes que iniciaram a 15 anos atrás. Temos como uma das limitações do estudo, o fato destes terem ocorrido no interior do Estado, por isso só foi possível fazer o seguimento clínico dos pacientes que vieram para Manaus e procuraram a FMTHVD.

De maneira geral observou-se semelhanças em alguns aspectos ao que já foi descrito nos surtos ocorridos em outros locais da Amazônia particularmente no Pará (31). Essas informações mostram que o perfil clínico e epidemiológico dos surtos ocorridos no Amazonas são os mesmos e demonstra que qualquer pessoa está vulnerável quando a doença está relacionada a transmissão oral. É importante o acompanhamento da evolução clínica desses pacientes e os aspectos particulares da linhagem circulante devem ser estudados para o melhor entendimento da evolução da doença na região.

Referências Bibliográficas

1. WHO. Neglected tropical diseases [Internet]. 2019. Available from: https://www.who.int/neglected_diseases/news/world-Chagas-day-approved/en/. Acesso em 28 de maio de 2019.
2. Carmo EH, Penna G, Oliveira WK. Emergências de saúde pública: conceito, caracterização, preparação e resposta. Vol. 22. 2008.
3. Pedroso, R.P.; Rocha OC. Infecções emergentes e reemergentes. Rev Med Minas Gerais. 2009;19(2):140–50.
4. Chagas C. 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. Vol. 1, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1909. p. 159–218.
5. Herrera L. Una revisión Herrera sobre reservorios de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. Boletín Malariol y Salud Ambient. 2010;L, nº1.
6. Magalhães LKC, Barbosa MG, Ciriano CM, Fabiano MP, Fé NF ; Fé FAA, Rodriguez IC, Gimaque JBL PS. Vetores e reservatórios da doença de Chagas no Amazonas. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:227–8.
7. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for

- something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 2018;184:38–52.
8. Dias CP, Ramos JN, Gontijo AD et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. In: *Epidemiologia e Serviços de Saúde.* 2016. p. 1–10.
 9. Silveira AC, Martins E. Histórico do controle da transmissão vetorial e situação epidemiológica atual. In: GALVÃO, C., org. *Vetores da doença de chagas no Brasil* [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6. Available from SciELO Books.; 2014. 10-25 p.
 10. Deane, L.; Jansen LG. Encontro de *Schizotrypanum Cruzi* (Chagas, 1909) em Marsupiais da espécie *Marmosa cinerea* Desmarest. *Memórias do Inst Evandro Chagas Parasitol.* 1939;413–6.
 11. Shaw J, Lainson R FH. . Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saúde Publ.* 1969;3:153–7.
 12. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of chagas disease. *Emerg Infect.* 2012;54(6):845–52.
 13. Barbosa M das GV, Ferreira JM BB, Arcanjo ARL, Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, et al. Chagas disease in the state of Amazonas: History, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(December 2013):27–33.
 14. Ferraroni JJ.; Nunes DP. Mello, JA e Carmago M. Moléstia de Chagas na Amazônia: Ocorrência de seis casos suspeitos, autóctones sorologicamente positivos. *Acta Amaz.* 1977;7(3):438–40.
 15. França MS, Frade JM, Konasugawa K, Almeida FB De. Doença de Chagas - primeiro caso autóctone na Amazônia Ocidental - Amazonas - Brasil . *Acta Amaz.* 1980;10(4):759–62.
 16. Souza-Lima R de C, Barbosa M das GV, Coura JR, Arcanjo ARL, Nascimento A da S, Ferreira JM BB, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(4):510–4.
 17. Monteiro WM, Barbosa MDGV, Toledo MJDO, Fé FA, Fé NF. Series of acute Chagas' disease cases attended at a tertiary-level clinic in Manaus, State of Amazonas, from 1980 to 2006. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):207–10.
 18. Gaunt, MW; Yeo, M; Frame, I A; Stothard JR et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature.* 2003;421(February):937–9.
 19. Lis JT. Fractionation of DNA Fragments by Polyethylene Glycol Induced Precipitation. *Methods Enzymol.* 1980;65(1974):347–53.

20. Paithankar KR, Prasad KSN. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(6):1346.
21. Kumar S, Nei M, Dudley J TK. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 2008;9(4):299–306.
22. Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W232–5.
23. Medeiros MB De, Guerra JA de O, Lacerda MVG de. Meningoencephalitis in a patient with acute Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(5):520–1.
24. Rojas Amadeo et al. Reunião Internacional sobre Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia . Implementação da Iniciativa Intergovernamental de Vigilância e Prevenção da doença de Chagas na Amazônia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(1):82–9.
25. Agrelo R et al. 2ª Reunião da Iniciativa Intergovernamental de Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(3):311–7.
26. Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010;201(9):1308–15.
27. de Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, et al. Update on oral chagas disease outbreaks in Venezuela: Epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(3):377–86.
28. Hernández LM, Ramírez Cano AN, Cucunubá Z, Zambrano P. Brote de Chagas Agudo en Lebrija , Santander 2008. *Artículo Inst.* 2008;4(November):28–36.
29. Santalla-Vargas S, Oporto P EE. Primer brote reportado de la enfermedad de Chagas en la Amazonia boliviana: reporte de 14 casos agudos por transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* en Guayaramerín, Beni-Bolivia. *Biofarbo.* 2011;19:52–8.
30. Beltrão H.B.M., Cerroni M. de P., Freitas D.R.C., Pinto A.Y.N., Valente V.C.A., Valente S., Costa E.G.J. S. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007. *Trop Doct.* 2009;39(4):231–2.
31. Pinto AYDN, Valente SA, Valente VDC, Ferreira AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(6):602–14.

32. Rodrigues I.C., Souza A.A. TR e VS. Doença de chagas na amazônia: I Registro de oito casos autóctones em Macapá. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1988;21(4):193–7.
33. Souza DO, Oliveira SM, Vivaldini S, Silveira AC, Junqueira A VP. Diagnóstico parasitológico direto de casos agudos de infecção por *Trypanosoma cruzi* em lâmina de malária na Amazônia brasileira: avaliação do treinamento e potencial do método. In: 45° Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2009 mar 6-9; . *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42.
34. Dias JCP, Prata A, Schofield J. Doença de Chagas na Amazônia : esboço da situação atual e perspectivas de prevenção . *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(6):669–78.
35. Bezerra VS. Açaí Congelado. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2007;
36. Ministério do Desenvolvimento I e CES da ZF de MS. Projeto Potencialidades Regionais Estudo de viabilidade Econômica: Açaí. Vol. 1, Instituto Superior de Administração e Economia ISAE/Fundação Getúlio Vargas (FGV). 2003.
37. Santana RG, Guerra M, B V, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz J V, et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(1):25–8.
38. Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Vol. 33, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 1991. p. 351–7.
39. Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MT V., Ceron CR. Problemática vetorial da Doença de Chagas. *Arq ciênc saúde.* 2004;11(1):44–7.
40. Ministério de Saúde. Boletim Epidemiológico. Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Secr Vigilância em saúde [Internet]. 2015;46(2358–9450):1–9. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020..pdf>
41. Laranja FS, Dias E NG. Clínica y terapeutica de la enfermedad de Chagas. *Prensa Med Argent.* 1951;38:465–84.
42. Brasil M. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. 2018;1–144.
43. Magalhães MB, Coelho LARC, Maciel MG, Ferreira JM BB, Umezawa ES, Coura JR, et al. Serological survey for Chagas disease in the rural areas of Manaus , Coari , and Tefé in the Western Brazilian Amazon Inquérito sorológico para doença de Chagas em áreas rurais de Manaus , Coari e Tefé na Amazônia Ocidental. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(6):697–702.

44. WHO. Anti-*Trypanosoma cruzi* assays: Operational Characteristics [Internet]. 2010. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75844>. Acesso em 28/05/2019.
45. Ortiz JV, Valessa B, Pereira M, Couceiro N, Regina M, Doria SS, et al. Avaliação Cardíaca na Fase Aguda da Doença de Chagas com Evolução Pós-Tratamento em Pacientes Atendidos no Estado do Amazonas, Brasil. *Soc Bras Cardiol*. 2018;
46. Alarcón de Noya, Belkisyolé; Martínez J. Transmisión oral de la enfermedad de chagas en Venezuela: un segundo brote escolar. *Rev la Fac Ciencias la Salud*. 2009;13(2).
47. Vargas A, Malta JMAS, Costa VM da, Cláudio LDG, Alves RV, Cordeiro G da S, et al. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2018;34(1):1–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2018000106001&lng=pt&tlng=pt
48. Monteiro WM, Margioto Teston AP, Gruending AP, dos Reis D, Gomes ML, Marques de Araújo S, et al. *Trypanosoma cruzi* I and IV Stocks from Brazilian Amazon Are Divergent in Terms of Biological and Medical Properties in Mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2):1–9.
49. Luquetti, Alejandro; Miles, A. Rassi; Rezende J.M.; De Souza, A. A.; Póvoa MM and R. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986;462–70.
50. Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LLC, Prestes SR, Maciel MG, Silva GAV, et al. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors*. 2014;7(267):1–7.
51. Monteiro WM, Magalhães LKC, de Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJDO, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One*. 2012;7(7):e41284.
52. Monteiro WM, Magalhães LK, Santana Filho FS, Borborema M, Silveira H, Barbosa MDG V. *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia: Short Communication. *Trop Med Int Heal*. 2010;15(9):1049–51.
53. Flore AC, Montilla M, Cucunuba ZM, Ramı JD, Guhl F. Molecular Epidemiology of Human Oral Chagas Disease Outbreaks in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2):1–8.
54. Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Rev da Biol*. 2011;6b:44–8.

55. Maeda FY, Clemente TM, Macedo S, Cortez C, Yoshida N. Host cell invasion and oral infection by *Trypanosoma cruzi* strains of genetic groups TcI and TcIV from chagasic patients. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016;1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1455-z>
56. Pontes VMO de, Souza Júnior AS de, Cruz FMT da, Coelho HLL, Dias ATN, Coelho ICB, et al. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(2):182–7.

4. LIMITAÇÕES

Este trabalho buscou unir informações de eventos que ocorreram em diferentes anos e municípios do estado e o primeiro evento ocorreu a 15 anos atrás, portanto tem-se como limitação do estudo a ocorrência no interior do estado, onde grande parte dos envolvidos não realizaram o seguimento clínico por não terem vindo para Manaus.

Por ter caráter retrospectivo e utilizado informações de prontuários e do SINAN, em diferentes períodos, houve dificuldades quanto a obtenção homogênea dos dados de todos os pacientes.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

A situação epidemiológica da doença de Chagas na Amazônia é diferente de regiões tradicionalmente endêmicas e vem sofrendo modificações nos últimos anos devido as transformações ambientais e de ordem econômica e social. Nesse sentido, os parasitos que circulavam estritamente no ciclo silvestre podem ocasionar a infecção humana devido a aproximação cada vez mais frequente do vetor no convívio doméstico e peridoméstico, sendo capaz de ocorrer a transmissão vetorial ou oral. Ao longo deste trabalho observou-se que há a necessidade de buscar respostas quanto a alguns temas que merecem ser investigados futuramente:

- 1) Até o momento ocorreram no Amazonas 6 surtos e todos em municípios da região central do estado. Isto pode está relacionado a infecção natural dos vetores nesta região, por isso, é importante realizar uma investigação entomológica e análise da investigação natural em municípios que já registraram casos de doença de Chagas, tanto surtos como isolados com provável transmissão vetorial para traçar um monitoramento entomológico nestas regiões.
- 2) Este trabalho também demonstrou que as linhagens Z3(TcIII/TcIV) e TcIV são as únicas isoladas nos pacientes dos surtos. Diante disto, há a necessidade de realizar estudos para avaliar o comportamento biológico das linhagens circulantes no Amazonas.
- 3) Passaram-se 15 anos do primeiro surto ocorrido no Amazonas e perguntas são feitas quanto a evolução destes pacientes, desde o

ocorrido em 2004 até o último em 2018. É importante sabermos como estes pacientes estão hoje. Portanto, é de extrema importância realizar um estudo de resgate destes pacientes para a realização de novos exames e acompanhamento na observação da cura clínica ou evolução para a DCC.

6. CONCLUSÃO

Os surtos da DC no Amazonas ocorreram na parte central do estado em diferentes municípios, exceto em Carauari onde ocorreram dois episódios seguidos (2011 e 2015), sem nenhuma associação entre as regiões até o momento. O período de ocorrência foi de dezembro a junho e o intervalo de tempo de um para o outro foi de 1 a 4 anos, em média 2 anos e seis meses.

A população envolvida nos surtos foi composta por 57% do sexo masculino e de todas as faixas etárias, desde bebê de 8 meses até idosos de 82 anos. A faixa etária prevalente foram adultos jovens de 19 a 34 anos. Dos 106 envolvidos, há informações de sinais e sintomas de 88,6%, geralmente inespecíficos e a síndrome febril foi a mais relatada em 99% dos casos.

A gota espessa foi realizada em todos os pacientes e em 86% dos casos foi o método de diagnóstico.

Outros exames parasitológicos complementares foram realizados como a Hemocultura, Xenodiagnóstico e xenocultura

Em todos os surtos ocorridos no estado, a linhagens de *T. cruzi* isolada destes pacientes foi TcIV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chagas C. 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. Vol. 1, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1909. p. 159–218.
2. WHO. Neglected tropical diseases [Internet]. 2019. Available from: https://www.who.int/neglected_diseases/news/world-Chagas-day-approved/en/. Acesso em 28 de maio de 2019.
3. Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MT V., Ceron CR. Problemática vetorial da Doença de Chagas. *Arq ciênc saúde*. 2004;11(1):44–7.
4. Barbosa M das GV, Ferreira JMBB, Arcanjo ARL, Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, et al. Chagas disease in the state of Amazonas: History, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(December 2013):27–33.
5. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Emerg Infect*. 2012;54(6):845–52.
6. Martins AV, Gomes AP, Mendonça EG et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Asoc Colomb Infectol*. 2012;16:45–8.
7. Dias JCP. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(4):370–5.
8. Brener Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: Dias JCP, Coura JR, editores. *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um Manual Prático para o Clínico Geral*. Rio de Janeiro: Editora da Fundação Oswaldo Cruz. In: FIOCRUZ. 1997. p. 25–31.
9. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):1051–4.
10. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop*. 2018;184:38–52.
11. Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop*. 1974;3:65–12.
12. Andrade S, Magalhães JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996;30(1):27–35.
13. Miles MA, Souza AA, Póvoa MM, Shaw JJ, Lainson R TP. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas`disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978;272:819–21.
14. Miles MA, Póvoa MM, Souza AA, Lainson R SJ and KD. Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75(5):667–74.
15. Tibayrenc M FA. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today*. 1991;7:228–32.
16. Souto RP FO, Macedo AM, Campbell DA ZB. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;83(2):141-(2):141–52.
17. Satellite Meeting, (1999). Recommendations from an international Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease, April 11-16 1999, Rio de Janeiro, Brazil. [Internet]. Vol. 94, Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999. p.

- 429–32. Available from: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/21856/2/oc99216.html>. Acesso em 10 de dezembro de 2018
18. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. *Science* (80-). 2005;309(5733):409–15.
 19. De Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2006;2(3).
 20. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC V, Veludo HH, Silva FMDA, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA , cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phyloge. *Parasitology*. 2009;
 21. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. Infection , Genetics and Evolution The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature : Rationale , epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012;12(2):240–53.
 22. Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop* [Internet]. 2015;151:166–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>
 23. Ramírez JD, Guhl F, Rendo ´n LM, Rosas F, Marin-Neto JA et al. Chagas Cardiomyopathy Manifestations and *Trypanosoma cruzi* Genotypes Circulating in Chronic Chagasic Patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):1–9.
 24. Enriquez GF, Cardinal M V., Orozco MM, Lanati L, Schijman AG, Gürtler RE. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* identified in rural dogs and cats in the humid Argentinean Chaco. *Parasitology*. 2013;140(3):303–8.
 25. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl(August):113–22.
 26. Monteiro WM; Magalhães LKC de Sá ARN; Gomes ML; Toledo MJdeO; Borges L; Pires L; Guerra JAO; Silveira H; Barbosa MGVB. *Trypanosoma cruzi* IV Causing Outbreaks of Acute Chagas Disease and Infections by Different Haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One*. 2012;7(7).
 27. Santana RG, Guerra M, B V, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz J V, et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(1):25–8.
 28. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(8):1–19.
 29. Szpeiter BB; Ferreira JIGS; Assis FFV; Stelmachtchuk FN, D; PJKAMAGSMA. Bat trypanosomes from Tapajós-Arapiuns Extractive Reserve in Brazilian Amazon. *Vet Parasitol*. 2017;2961(june):152–8.
 30. Estudo dos triatomíneos [Internet]. 2005. Available from: <http://brasil.campusvirtualsp.org/sites/default/files/modulo3.pdf>. Acesso em 27 de maio de 2019.
 31. Jurberg, J.; Rodrigues, J.M.S.; Moreira, F.F.F.; Dale, C.; Cordeiro, I.R.S.; Lamas Jr, V.D.; Galvão, C.; Rocha DS. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (Vetores

- da doença de Chagas). 2014.
32. Schofield C. Triatominae: biology & control. West Sussex Eurocommunica Publ. 1994;80.
 33. Noireau F, Carbajal-De-La-Fuente AL, Lopes CM, Diotaiuti L. Some considerations about the ecology of Triatominae. An Acad Bras Cienc. 2005;77(3):431–6.
 34. Mesquita RD, Vionette-Amaral RJ, Lowenberger C, Rivera-Pomar R, Monteiro FA, Minx P, et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2015;112(48):14936–41. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1506226112>
 35. Díaz-Albiter HM, Ferreira TN, Costa SG, Rivas GB, Gumiel M, Cavalcante DR, et al. Everybody loves sugar: First report of plant feeding in triatomines. Parasites and Vectors. 2016;9(1):1–8.
 36. Carvalho DB, Almeida CE, Rocha CS, Gardim S, Mendonça VJ, Ribeiro AR, et al. A novel association between *Rhodnius neglectus* and the *Livistona australis* palm tree in an urban center foreshadowing the risk of Chagas disease transmission by vectorial invasions in Monte Alto City, São Paulo, Brazil. Acta Trop. 2014;130(1):35–8.
 37. Miles MA, De Souza AA, Pova M. Chagas Disease in the Amazon Basin III. Ecotopes of ten Triatomine Bug Species Hemiptera Heteroptera Reduviidae From the Vicinity of Belem-Para State Brazil. J Med Entomol. 1981;18(4):266–78.
 38. Lainson R, Shaw JJ, Fraiha H, Miles MA DC. Disease in the Amazon Basin: 1 – Trypanosoma cruzi infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1979;73:193–204.
 39. Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. Trypanosoma cruzi: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum Didelphis marsupialis. Vol. 79, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1984. p. 513–5.
 40. Herrera L. Una revisión Herrera sobre reservorios de Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. Boletín Malariol y Salud Ambient. 2010;L, nº1.
 41. Dias CP, Ramos JN, Gontijo AD et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. In: Epidemiologia e Serviços de Saúde. 2016. p. 1–10.
 42. WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Wkly Epidemiol Rec. 2015;90(6):33–44.
 43. Ministério de Saúde. Boletim Epidemiológico. Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Secr Vigilância em saúde [Internet]. 2015;46(2358–9450):1–9. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020..pdf>
 44. Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. 2002;18(4):171–6.
 45. Monteiro WM, Barbosa MDGV, Toledo MJDO, Fé FA, Fé NF. Series of acute Chagas' disease cases attended at a tertiary-level clinic in Manaus, State of Amazonas, from 1980 to 2006. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(2):207–10.
 46. Medeiros MB De, Guerra JA de O, Lacerda MVG de. Meningoencephalitis in a patient with acute Chagas disease in the Brazilian Amazon. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(5):520–1.
 47. Dias JCP. Dias JCP. Acute Chagas Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 85-79. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984;79:79–85.
 48. Dias JCP. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical



- epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989;22(3):147–56.
49. Rassi AJ, Rassi A, William C L. Chagas' Heart Disease. *Clin Cardiol.* 2000;23:883–9.
 50. Dias J, and Coura, JR. O. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Ed FIOCRUZ. 1997;486.
 51. Portela-Lindoso AAB; Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: Do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saude Publica.* 2003;37(1):107–15.
 52. Castro CN. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1983;98–103.
 53. Brasil M. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. 2018;1–144.
 54. Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR KA. Hemocultura: técnica sensível na detecção de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994;27:134–8.
 55. Brumpt E. Le *Trypanosoma Cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex Boueti* et *Ornithodoros moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. Vol. 5, Bulletin de la Société de pathologie exotique. 1912. p. 360–7.
 56. Dias E. Técnicas do xenodiagnóstico na molestia de Chagas. Inst Oswaldo Cruz. 1940;
 57. Brasil D-S. Boletim Epidemiológico de Doenças de Chagas , janeiro de 2018 Ign / Branco Confirmado Descartado Inconclusivo Total. 2018;(Dc).
 58. De Oliveira Ferreira H. Tratamento Da Forma Indeterminada Da Doença De Chagas Com Nifurtimox E Benzonidazol. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1991;23(4):209–11.
 59. Pontes VMO de, Souza Júnior AS de, Cruz FMT da, Coelho HLL, Dias ATN, Coelho ICB, et al. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):182–7.
 60. WHO. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). 2018.
 61. WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. In: Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases [Internet]. 2017. p. 191. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases
 62. Silveira AC, Martins E. Histórico do controle da transmissão vetorial e situação epidemiológica atual. In: GALVÃO, C., org. Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6. Available from SciELO Books.; 2014. 10-25 p.
 63. Villela MM, Souza JM., Melo VP, Dias JC. Avaliação do Programa de Controle da doença de Chagas em relação à presença de *Panstrongylus megistus* na região centro-oeste do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Pública.* 2009;25(4):907–17.
 64. Brasil. Nota técnica N°01/2017 DIVEP/LACEN/SUVISA/SESAB vigilância, diagnóstico e tratamento da doença de Chagas no estado da Bahia. 2017.
 65. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da doença de Chagas [Internet]. 2018 [cited 2018 Jul 31]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica>
 66. Eduardo MB de P. GUIA PRÁTICO DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE SURTOS DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. 2008.

67. Carmo EH, Penna G, Oliveira WK. Emergências de saúde pública: conceito, caracterização, preparação e resposta. Vol. 22. 2008.
68. Pinto AYDN, Valente SA, Valente VDC, Ferreira AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(6):602–14.
69. Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis*. 2010;201(9):1308–15.
70. de Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, et al. Update on oral chagas disease outbreaks in Venezuela: Epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):377–86.
71. Santalla-Vargas S, Oporto P EE. Primer brote reportado de la enfermedad de Chagas en la Amazonia boliviana: reporte de 14 casos agudos por transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* en Guayaramerín, Beni-Bolivia. *Biofarbo*. 2011;19:52–8.
72. Hernández LM, Ramírez Cano AN, Cucunubá Z, Zambrano P. Brote de Chagas Agudo en Lebrija , Santander 2008. *Artículo Inst*. 2008;4(November):28–36.
73. Steindel M, Kramer L, Scholl D, Soares M, Hermes P, Maria S, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans , vectors , and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State , Brazil. *diagnostic Microbiol Infect Dis*. 2008;60:25–32.
74. Vargas A, Malta JMAS, Costa VM da, Cláudio LDG, Alves RV, Cordeiro G da S, et al. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. *Cad Saude Publica [Internet]*. 2018;34(1):1–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2018000106001&lng=pt&tlng=pt
75. Beltrão H.B.M., Cerroni M. de P., Freitas D.R.C., Pinto A.Y.N., Valente V.C.A., Valente S., Costa E.G.J. S. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007. *Trop Doct*. 2009;39(4):231–2.
76. Souza-Lima R de C, Barbosa M das GV, Coura JR, Arcanjo ARL, Nascimento A da S, Ferreira JMBB, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(4):510–4.
77. Monteiro WM, Magalhães LKC, de Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJDO, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One*. 2012;7(7):e41284.
78. Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1911;278–300.
79. Floch H; Taque. Un cas de maladie de Chagas en Guyane Française. *Bull Soc Path Exot*. 1941;40:36–7.
80. Shaw J, Lainson R FH. . Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saúde Publ*. 1969;3:153–7.
81. Ferraroni JJ.; Nunes DP. Mello, JA e Carmago M. Moléstia de Chagas na Amazônia: Ocorrência de seis casos suspeitos, autóctones sorologicamente positivos. *Acta Amaz*. 1977;7(3):438–40.

82. Coura JR et al. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica? *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994;27(4):251–3.
83. Matta A. Um novo reduvídeo do Amazonas, *Rhodnius brethesi* n. sp. *Amaz Med.* 1919;2:93–4.
84. França MS, Frade JM, Konasugawa K, Almeida FB De. Doença de Chagas - primeiro caso autóctone na Amazônia Ocidental - Amazonas - Brasil . *Acta Amaz.* 1980;10(4):759–62.
85. Monteiro WM, Magalhães LK, Santana Filho FS, Borborema M, Silveira H, Barbosa MDG V. *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia: Short Communication. *Trop Med Int Heal.* 2010;15(9):1049–51.
86. Yokomizo GK-Iti, Mochiutti S, Queiroz JAL, Santos GR, Furtado RG, Brandão AP Cl. Estimativas de Parâmetros Genéticos para caracteres de Frutos em Açaizeiros no Amapá. *Ciência Florest.* 2016;26(3):985–93.
87. Oliveira PRB, Costa CA, Bem GF, Cordeiro VSC, Santos IB, Carvalho LCRM, Conceição, E. P. S.; Lisboa, P. C.; Ognibene, D. T.; Sousa, P. J. C.; Martins, G. R.; Silva AJR, Moura RS, Resende AC. Oliveira PRB, Costa CA, Bem GF, Cordeiro VSC, Santos IB, Carvalho RA. *Euterpe oleracea* Mart.- derived polyphenols protect mice from diet-induced obesity and fatty liver by regulating hepatic lipogenesis and cholesterol excretion. *PLoS One.* 2015;10:12.

8. APÊNDICES E ANEXOS

8.1 Procedimentos Operacionais Padrão (POP) – Obtenção de dados

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP TÍTULO: Obtenção de dados referentes ao número casos de doenças de notificação compulsória a partir do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)		
Elaborado por: Arineia Soares da Silva	Revisado e aprovado por: Jorge Augusto de Oliveira Guerra	Data de aplicação Abril de 2019
		Data da próxima revisão Abril de 2020

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento para obtenção de dados referentes a doenças de notificação compulsória a partir do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

2. DEFINIÇÕES

O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) é uma base de dados alimentada pela notificação e investigação dos casos de doenças e agravos considerados de notificação compulsória. Porém, os estados e municípios podem incluir outros problemas de saúde considerados importantes em sua região. A utilização efetiva deste Sistema, contribui no diagnóstico da ocorrência de um evento em determinada população, o que pode fornecer subsídios para se explicar as causas deste evento, auxiliando ainda na identificação da realidade epidemiológica de determinada área geográfica.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O uso sistemático e descentralizado desta base de dados contribui para a democratização da informação, e permite livre acesso à informação para todos os

profissionais da saúde e para a comunidade de modo geral. Sendo, portanto, um relevante instrumento de auxílio ao planejamento da saúde.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade, alunos, pesquisadores e pessoal técnico.

5. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

6. EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Não se aplica

7. RECURSOS NECESSÁRIOS

7.1 Equipamentos:

7.1.1 Computador com acesso à internet.

8. PROCEDIMENTOS

8.1. Entrar no site do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN (<http://portalsinan.saude.gov.br/>).

8.2. Acessar a aba “Acesso à informação” >> Clicar em Dados Epidemiológicos Sinan;

8.3. Clicar em: Doenças e Agravos de Notificação - Até 2006 (Para dados até 2006)

ou

Doenças e Agravos de Notificação - De 2007 em diante (Para dados de 2007 em diante). Em seguida selecionar o agravo estudado.

8.4. Escolher Região, período e variáveis de acordo com o objetivo do estudo.

8.5. Clicar em “Mostrar” >> Em seguida clicar em “COPIAR COMO .CSV”.

8.6. Extrair os dados e organizar a planilha Excel.

9. PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

Não se aplica

10. LIMITAÇÕES

10.1. Não possuir acesso à internet;

10.2. Computador com memória e processador que não suporte o armazenamento e processamento dos dados;

10.3. Não disponibilidade dos dados.



11. REFERÊNCIAS

1- Sistema de Informação de Agravos. Doença de Chagas: Casos confirmados notificados de Sistema de Agravos de Notificação – Sinan Net. 2018.

12. ANEXOS

Não se aplica

8.2 Procedimentos Operacionais Padrão (POP) – Extração de DNA

	<p align="center">FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	
<p align="center">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP</p>		
<p>TÍTULO: EXTRAÇÃO DE DNA POR KIT UTILIZANDO PURELINK KIT® (INVITROGEN)</p>		
<p>Elaborado por: Débora Raysa T. de Sousa</p>	<p>Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra Rosa Amélia Gonçalves Henrique Silveira</p>	<p>Data de aplicação 25 de abril de 2019 Data da próxima revisão 25 de abril de 2020</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento para extração de DNA de *Trypanosoma cruzi* a partir da camada leucoplaquetária (*buffy coat*), cultura, vetor ou fezes, intestino do vetor e material no papel de filtro.

2. DEFINIÇÕES

É o isolamento da molécula de DNA a partir de material biológico.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial complementar.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável técnico, alunos de doutorado, e de mestrado. Alunos de iniciação científica devem ser acompanhados.

5. POP'S RELACIONADOS

POP_ENT_Procedimento da Reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* – Protocolo GPI (Gene da Glicose-6-fosfato isomerase).

POP_ENT_ Protocolo de purificação para o sequenciamento: Precipitação do produto da PCR com Polienoglicol (PEG).

POP_ENT_ Protocolo da reação de sequenciamento para o analisador automático ABI 310 (sequenciador).

6. EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Jaleco, luvas, máscara e touca.

7. RECURSOS NECESSÁRIOS

7.1 Amostra

7.1.1. Cama leucoplaquetária (*buffy coat*) (Anexo 1), cultura, vetor ou fezes, intestino do vetor e material no papel de filtro.

7.2 Materiais

7.2.1. Microtubo (Eppendorf) de 1,5 mL.

7.2.2. Ponteiros descartáveis com filtro, em suporte apropriado.

7.2.3. Pipetal de 2 µL, 10 µL, 100 µL e 1000 µL.

7.2.4. Caixa de descarte de material com hipoclorito de sódio.

7.2.5. Frasco lavador com álcool 70%.

7.3 Equipamentos

7.3.1. Centrífuga

7.3.2. Banho-maria e termômetro (56°C)

7.3.3. Agitador de tubos (Vortex)

7.4 Reagentes, meios e soluções

7.4.1. PureLink Kit® (Invitrogen) – Genomic Digestion Buffer, Genomic Lysis/Binding Buffer, Wash Buffer 1 e 2, Genomic Elution Buffer, Proteinase K, RNase A.

7.4.2. PBS (Phosphate-buffered saline) pH 7,2.

7.4.3. Etanol 96-100%.

8. PROCEDIMENTOS

8.1. Informações importantes antes de iniciar os procedimentos.

Vários procedimentos devem ser seguidos para evitar a contaminação das amostras submetidas a PCR:

*Limpar a bancada onde irá trabalhar e as pipetas que irão utilizar com hipoclorito de sódio e álcool 70% antes e depois do procedimento.

*Empregar materiais de consumo novos (não reciclados).

*Distribuir os reagentes em pequenas alíquotas, incluído o kit com a enzima.

*Utilizar apenas ponteiras protegidas por filtros.

*Empregar tubos tipo Eppendorf que apresentem um sistema de lacre para evitar extravasamento de amostras durante a homogeneização.

*Todo o material permanente deverá ser limpo com hipoclorito de sódio e submetido à luz UV.

*Durante toda a execução da técnica, usar luvas que deverão ser descartadas a cada contaminação por amostra ou quando achar necessário.

8.2. Material: camada leucoplaquetária (*buffy coat*), cultura

Obs: Retirado do Manual da PureLink Genomic DNA Kits® (Invitrogen):

Blood Lysate.

8.2.1. Em um microtubo (Eppendorf), adicionar 200 µL do material (se < 200 µL, completar com PBS);

8.2.2. Adicionar 20 µL de Proteinase K;

8.2.3. Adicionar 20 µL de RNase A, vortexar e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos;

8.2.4. Adicionar 200 µL do Genomic Lysis/Binding Buffer e vortexar para obter uma solução homogênea;

8.2.5. Incubar a 55°C por 10 minutos;

8.2.6. Adicionar 200 µL de etanol (96-100%), vortexar por 5 segundos;

8.2.7. *Utilizar a coluna e o tubo coletor;*

8.2.8. Adicionar aproximadamente 640 µL do lisado (cuidade com a esponja da coluna!);

8.2.9. Centrifugar a coluna a uma velocidade de 10 000 x g (ou 10 350 rpm) por 1 minuto;

8.2.10. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna em um novo tubo coletor;

8.2.11. Adicionar 500 µL de Wash Buffer 1 (observar se está preparado);

- 8.2.12. Centrifugar a coluna a uma velocidade de 10 000 x g (ou 10 350 rpm) por 1 minuto;
- 8.2.13. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna em um novo tubo coletor;
- 8.2.14. Adicionar 500 µL de Wash Buffer 2 (observar se está preparado);
- 8.2.15. Centrifugar a coluna em velocidade máxima por 3 minutos;
- 8.2.16. Colocar a coluna em um novo microtubo (Eppendorf);
- 8.2.17. Adicionar mais 25 µL - 200 µL do Genomic Elution Buffer na coluna;
- 8.2.18. Centrifugar a coluna em velocidade máxima por 2 minutos;
- 8.2.19. O microtubo (Eppendorf) contém o DNA purificado, remover e descartar coluna;
- 8.2.20. Armazenar o DNA extraído em freezer a -20°C.

8.3. Material: Vetor e fezes com intestino do vetor

Obs: Retirado do Manual da PureLink Genomic DNA Kits® (Invitrogen):

Mammalian tissue and mouse/rat tail lisate.

- 8.3.1. Utilizar ¼ do vetor, remover e descartar as pernas;
- 8.3.2. Adicionar 90 µL do Genomic Difestion Buffer e macerar;
- 8.3.3. Adicionar mais 90 µL do Genomic Difestion Buffer ao macerado;
- 8.3.4. Adicionar 20 µL de Proteinase K;
- 8.3.5. Incubar a 55°C de 4 a 24 horas;
- 8.3.6. Centrifugar em velocidade máxima por 3 minutos em temperatura ambiente;
- 8.3.7. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo (Eppendorf);
- 8.3.8. Adicionar 20µL de RNase A, vortexar e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos;
- 8.3.9. Adicionar 200µL do Genomic Lysis/Binding Buffer e vortexar para obter uma solução homogênea;
- 8.3.10. Adicionar 200µL de etanol (96-100%), vortexar por 5 segundos;
- 8.3.11. *Seguir os mesmos procedimentos desde o item 8.2.7.*

8.4. Material: Papel de filtro com material

Obs: Retirado do Manual da PureLink Genomic DNA Kits® (Invitrogen): Blood spots.

- 8.4.1. Cortar 2-5 pedaços de papel filtro cada 2-3mm e adicionar em um microtubo (Eppendorf);
- 8.4.2. Adicionar 90 µL do Genomic Difestion Buffer e macerar;

- 8.4.3. Adicionar mais 90 μ L do Genomic Difestion Buffer ao macerado;
- 8.4.4. Adicionar 20 μ L de Proteinase K;
- 8.4.5. Incubar a 55°C por 30 minutos;
- 8.4.6. Centrifugar em velocidade máxima por 2-3 minutos,
- 8.4.7. Transferir todo o líquido para um novo microtubo (Eppendorf);
- 8.4.8. Adicionar 20 μ L de RNase A, vortexar e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos;
- 8.4.9. Adicionar 200 μ L do Genomic Lysis/Binding Buffer e vortexar param obter uma solução homogênea;
- 8.3.10. Adicionar 200 μ L de etanol (96-100%), vortexar por 5 segundos;
- 8.3.11. *Seguir os mesmos procedimentos desde o item 8.2.7.*

9. PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

1. Livro de protocolo do fabricantes do Purelink Genomic DNA Kits, invitrogen.

10. LIMITAÇÕES

- 10.1. O material de sangue ou cultura, para ser extraído, é necessário, segundo o fabricante, ter no mínimo 200 μ L de material;
- 10.2. Protocolos de extração por kit geralmente perdem mais DNA no processo de purificação do que protocolos de extração utilizando métodos caseiros.

11. REFERÊNCIAS

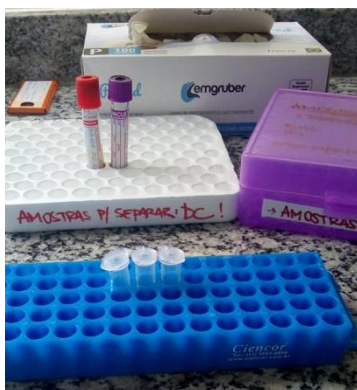
1. Schaerfer R. Técnicas em Biologia Molecular. Embrapa. 2006.

12. ANEXOS

- 12.1 Separação do soro, plasma e camada leucocitária nas amostras (*"buffy coat"*).

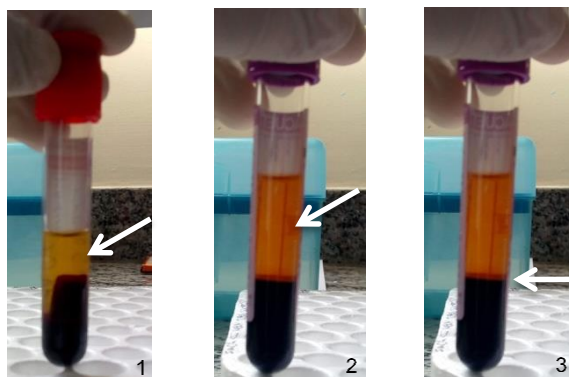
Anexo I

12.1 Separação do soro, plasma e camada leucocitária nas amostras (“*buffy coat*”).



Fonte: Ortiz, J. 2019.

Etapa 1: Separar três microtubos e identificar.





Fonte: Ortiz, J. 2019.

Etapa 2: Do tubo vermelho separar o soro (1), do tubo roxo separar plasma (2) e o “*buffy coat*” (3)

Obs: Este material deve ser armazenado em freezer -20°C

8.3 Procedimentos Operacionais Padrão (POP) – Procedimentos para realização da PCR

	<p align="center">FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP		
<p>TÍTULO: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>- Protocolo GPI (Gene da Glicose-fosfato isomerase)</p>		
<p>Elaborado por: Rosa Amélia G. Santana Henrique Silveira Laylah Magalhães Débora Raysa T. de Sousa</p>	<p>Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra</p>	<p>Data de aplicação 25 de abril de 2019</p>
<p>Adaptado por: Arineia Soares da Silva</p>		<p>Data da próxima revisão 25 de abril de 2020</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase), protocolo GPI- Gene da Glicose-fosfato isomerase para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e diferenciação de linhagens TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI.

2. DEFINIÇÕES

Reação em cadeia da polimerase: Técnica molecular que permite a amplificação de pequenas quantidades de um DNA específico a partir de um molde de DNA, por meio de uma reação enzimática, na ausência de um organismo vivo. Iniciador ou primer: pequena sequência de DNA ou RNA a partir da qual pode se iniciar a replicação do DNA.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial de pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade, alunos, pesquisadores e pessoal técnico.

5. POP´S RELACIONADOS

POP_ENT- Procedimento para extração de DNA por kit utilizando PureLink Kit® (Invitrogen)

6. EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Touca descartável, luvas de látex, máscara descartável, jaleco

7. RECURSOS NECESSÁRIOS

DNA extraído: A partir da extração por Kit ou caseira

7.1. Materiais:

7.1.2.1 Tubo tipo Eppendorf de 0,2 mL e 1,5 mL

7.1.2 Ponteiras descartáveis com filtro autoclavadas e em suporte apropriado

7.1.3 Pipetas de 2, 10, 100 e 1.000 µL

7.1.4 Caixa de descarte de material com hipoclorito de sódio

7.1.5 Frasco lavador com álcool 70%

7.1.6 Elenmeyer 100ml

7.1.7 Proveta 100ml

7.2 Equipamentos:

7.2.1 Termociclador

7.2.2 Fonte de eletroforese

7.2.3 Agitador de tubos

7.2.4 Microondas

7.3 Reagentes, meios e soluções:

7.3.1 Frasco com água Ultra Pura

7.3.2 Buffer de PCR 10x

7.3.3 MgCl₂ 50mM

7.3.4 Nucleotídeos dATP + dCTP + dTTP + dGTP 10mM

7.3.5 Primer: GPI-for (5"CGCACACTGGCCCTATTATT) 50mM

7.3.6 Primer: GPI-rev (5"TTCCATTGCTTTCCATGTCA) 50mM

7.3.7 Enzima Taq Polymerase Platinum 5U

7.3.8 Marcador de peso molecular

Diluir o marcador (40µl de água destilada+ 10µl de tampão de corrida + 10µl de marcador de peso molecular)

7.3.9 Solução Tampão para eletroforese

Obs: Diluir o TBE 10X para 1X (100ml de TBE 10X para 900ml de água destilada.

7.3.10 Tampão de corrida

7.3.11 rometo de etídio

8. PROCEDIMENTOS

8.1. Informações importantes antes de iniciar os procedimentos

*Vários procedimentos devem ser seguidos afim de se evitar a contaminação das amostras submetidas a PCR:

*Limpar a bancada onde o procedimento será realizado, bem como as pipetas que serão utilizadas com hipoclorito de sódio e álcool 70% antes e depois do procedimento.

*Empregar materiais de consumo novos (não reciclados). - distribuir os reagentes em pequenas alíquotas, incluído o kit com a enzima.

*Utilizar apenas ponteiros protegidas por filtros.

*Empregar tubos tipo Eppendorf que apresentem um sistema de lacre para evitar extravasamento de amostras durante a homogeneização.

*Todo o material permanente deverá ser limpo com hipoclorito de sódio e submetido à luz UV.

*Durante toda a execução da técnica, usar luvas que deverão ser descartadas a cada contaminação por amostra ou quando achar necessário.

*Realizar o manuseio do produto amplificado em sala separada, com equipamentos também individualizados inclusive o jaleco.

*Na etapa da pré-amplificação, todos os tubos com reagentes deverão ser deixados em banho de gelo até o momento de serem introduzidos no termociclador.

8.2. Mix da PCR

As quantidades fornecidas a seguir correspondem a valores empregados para uma única

amostra de DNA.

Obs: A cada reação incluir uma alíquota de amostra comprovadamente positiva, além do controle negativo (apenas o mix)

8.2.1 Em um microtubo tipo eppendorf, acrescentar os seguintes produtos:

Reagentes	Quantidade (µl)
H ₂ O	34,80
Buffer de PCR 10x	5,00
MgCl ₂	2,00
dNTP	1,00
GPI-for	1,00
GPI-rev	1,00
Taq DNA Polimerase	0,20
Total	45,00
DNA	5,00

Obs: Adicionar os reagentes na ordem do maior volume para o menor, deixando a Taq Polimerase por último. A mistura deve ser realizada o tempo todo no gelo.

8.2.2 Após homogeneização, transferir 45 µL da mistura anterior para um tubo Eppendorf de 0,2 µL;

8.2.3 Adicionar 5µL do DNA extraído.

8.3 Ciclos Térmicos

8.3.1 Introduzir os tubos no termociclador, programado para os seguintes ciclos temperatura e tempo:

94°C	5 min	1X
94°C	30 seg	35X
60°C	30 seg	
72°C	50 seg	

72°C	5 min	1X
4°C	infinito	

8.4 Controles

8.4.1 A cada reação adicionar uma amostra comprovadamente positiva e uma negativa (um eppendorf com apenas o mix)

8.5 Eletroforese

8.5.1 Para fazer um gel de 2%

8.5.1.1 Pesar 2g de agarose

8.5.1.2 Medir em uma proveta 100ml de TBE

8.5.1.3 Adicionar em um elenmeyer a agarose e o TBE

8.5.1.4 Levar ao micro-ondas até diluir (aparência límpida)

8.5.1.5 Montar uma placa molde com um pente para formar os poços no gel

8.5.1.6 Adicionar a mistura na placa e aguardar a polimerização

8.5.2. Colocar a placa com gel na cuba de eletroforese

8.5.3. Adicionar o tampão de eletroforese (TBE 1x).

8.5.4. Misturar 2 µL de tampão de corrida e 8 µL de DNA amplificado em cada poço no gel

8.5.5. No primeiro poço do gel aplicar 5 µL da solução diluída do marcador de peso molecular

8.5.6. Promover uma corrida de aproximadamente 40 minutos a 100V (volts) e 90 de corrente.

8.6 Revelação

8.6.1 Fazer a leitura do gel no Transiluminador- UV

8.6.2 A visualização de uma única banda de pares de base de ~800pb indicará a presença de DNA de *Trypanosoma cruzi* amplificado (PCR positiva).

9. PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

Não se aplica

10. LIMITAÇÕES

10.1. Deve-se manter o material no gelo, pois pode haver degradação do DNA;

10.2. Deve-se manter os reagentes no gelo para manter a estabilidade;

10.3. A PCR é uma técnica muito sensível e deve-se tomar muito cuidado para não contaminar as amostras;

10.4. Deve-se ter em cada reação uma amostra de controle positivo (amostra de cultura positiva) e uma amostra de controle negativo (reagentes sem amostra, apenas água ultrapura).

11. REFERÊNCIAS



1- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GA, Acosta N, Arias AR, Miles MA. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 2003; 241: 936-9.

2- Schaefer R. Técnicas em Biologia Molecular. Embrapa. 2006.

12. ANEXOS

Não se aplica

8.4 Procedimentos Operacionais Padrão (POP) – Purificação para sequenciamento do produto da PCR

	<p align="center">FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP		
TÍTULO: Protocolo de purificação para o sequenciamento: Precipitação de produto da PCR com Polienoglicol (PEG)		
Elaborado por: George Allan Silva Adaptado por: Débora Raysa	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra Rosa Amélia Gonçalves Santana	Data de aplicação Abril de 2019 Data da próxima revisão Abril de 2020

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento da purificação do produto da PCR antes de ir para o sequenciamento.

2. DEFINIÇÕES

A precipitação com Polietilenoglicol (PEG) atua como método de purificação da PCR com objetivo de remoção de oligos e nucleotídeos não incorporados na PCR que poderiam interferir na reação de sequenciamento. Apresenta um bom rendimento, podendo utilizar somente 0,5-1 μ L da amostra na reação de sequenciamento. O método não é recomendado para PCR com bandas inespecíficas ou com primer dímeros.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial de pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

5. POP'S RELACIONADOS

POP_ENT- Procedimento para extração de DNA por kit utilizando PureLink Kit® (Invitrogen).

POP_ENT- Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*- Protocolo COII (subunidade II da citocromo oxidase).

POP_ENT- Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*- Protocolo GPI (Gene da Glicose-fosfato isomerase).

POP_ENT- Protocolo de reação de sequenciamento para analisador automático ABI 310 (sequenciador).

6. EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Touca descartável, luvas de látex, máscara descartável, jaleco.

7. RECURSOS NECESSÁRIOS

7.1. Solução PEG (20% w/v PEG, 2,5M NaCl)

7.1.1. 10g de Polietilenoglicol 8000

7.1.2. 7,3g de NaCl

7.1.3. Adicionar 35 mL de H₂O miliQ

7.1.4. Agitar para solubilizar o PEG durante 20 minutos, ou até o mesmo encontrar-se solúvel;

7.1.5. Posteriormente, completar o volume para 50 mL com H₂O miliQ.

7.2. Antes de iniciar o procedimento:

7.2.1. Armazenar o etanol 80% a -20°C;

7.2.2. Programar o banho-maria ou banho seco (termobloco) a 37°C.

7.3. Procedimento:

7.3.1. Identificar os tubos 1,5 mL;

7.3.2. Adicionar PEG (20%) nos tubos identificados. O mesmo volume a ser utilizado da PCR (20 µL de PEG - 20 µL de amostra);

Obs: antes de transferir o PEG realize a homogeneização do mesmo.

7.3.3. Agitar suavemente em vórtex por 5 segundos e dar um breve spin (centrifugação);

7.3.4. Incubar a 37°C por 15 minutos no termobloco;

7.3.5. Após incubação, centrifugar a 2500 rcf (6.000 rpm) por 15 minutos a temperatura ambiente;

7.3.6. Descartar o sobrenadante e secar até retirar todo o PEG (bater o tubo de cabeça para baixo);

7.3.7. Adicionar 125µL de etanol 80% gelado e em seguida centrifugue a 1450 rcf (4.500 rpm) por 2 minutos;

7.3.8. Descartar o sobrenadante e deixar o tubo bem seco (bater o tubo de cabeça para baixo) para remoção de resíduos de etanol;

7.3.9. Incubar a 60° C no termobloco por 10 minutos de tampa aberta para remover resíduos de etanol (certificar a ausência de resíduos de etanol);

7.3.10. Adicionar água ultrapura morna, sendo adicionado o mesmo volume inicial da PCR;

7.3.11. Agitar em vórtex por 5 segundos e armazenar amostra a -20°C;

Obs: Antes do armazenamento da amostra a -20°C armazenar a 4-5°C por uma hora para melhor eluição do DNA.

8. PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

Não se aplica

9. LIMITAÇÕES

Não se aplica

10. REFERÊNCIAS



1. Silva, GAV; Ramasawmy, R; Boechat, AL, et al. Association of TNF à 1031 C / C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, Brazil. Human. Immunology. 2015;76, (2-3):137- 141.

2. Silva, GAV; Barletta-Naveca, RH; Carvalho BKS, et al. Haplotype of the Promoter Region of TNF Gene May Mark Resistance to Tuberculosis in the Amazonas State, Brazil. Journal of Clinical & Cellular Immunology. 2016; 7, (3): 1-6.

11. ANEXOS

Não se aplica.

8.5 Procedimentos Operacionais Padrão (POP) – Reação de sequenciamento

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRAO – POP		
TÍTULO: Protocolo de reação de sequenciamento para analisador automático ABI 310 (sequenciador)		
Elaborado por: George Allan Silva Lahyla Kelre Magalhães Adaptado por Débora Raysa	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra Rosa Amélia Gonçalves Santana	Data de aplicação Abril de 2019 Data da próxima revisão Abril de 2020

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento da reação de sequenciamento utilizando o sequenciador automático ABI 310.

2. DEFINIÇÕES

O sequenciamento de DNA é o processo realizado após a PCR e é o processo realizado para se determinar a sequência exata de nucleotídeos em uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico). Isso possibilita identificar o organismo ao qual pertence uma amostra e diferenciar cepas de microrganismos patogênicos.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial de pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

5. POP'S RELACIONADOS

POP_ENT- Procedimento para extração de DNA por kit utilizando PureLink Kit® (Invitrogen).

POP_ENT- Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*- Protocolo GPI (Gene da Glicose-fosfato isomerase).

POP_ENT- Protocolo de purificação para o sequenciamento: Precipitação de produto da PCR com Polienoglicol (PEG).

6. EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Jaleco, calçado fechado, máscara, luvas, touca

7. RECURSOS NECESSÁRIOS

7.1. Materiais necessários

7.1.1-Tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL

7.1.2- Ponteiras descartáveis com filtro em suporte apropriado

7.1.3- Pipetas de 2, 10, 100 e 1.000 µL

7.1.4-Caixa de descarte de material com hipoclorito de sódio

7.1.5- Placa de sequenciamento

7.1.6- Fita seladora de placas de sequenciamento

7.2 Reagentes necessários

7.2.1- Kit de reagentes de sequenciamento BigDye Termineitor 3.1 (Buffer 5X e BigDye)

7.2.2- EDTA 125mM

7.2.3- Acetato de sódio a 3M

7.2.4- Etanol 70%

7.2.5- Formamida HI-DI (Highly deionized- Altamente deionizada)

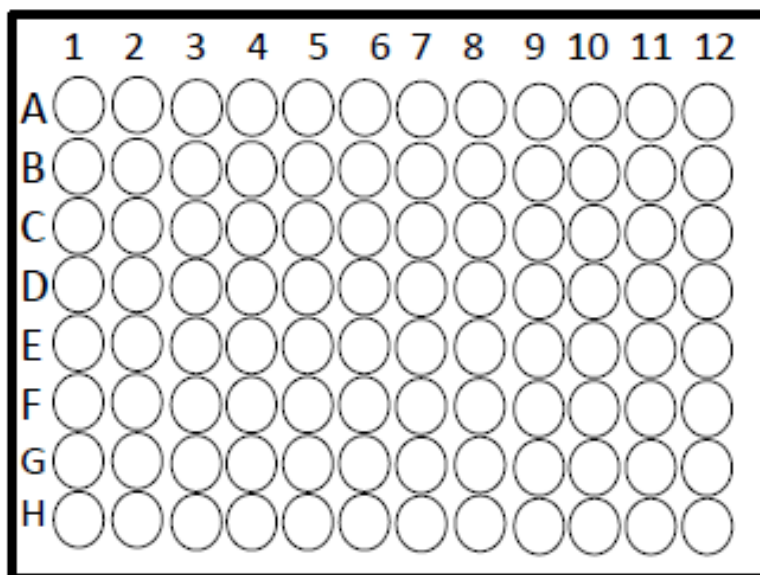
8. PROCEDIMENTOS

8.1. Preparação do Mix

- Separar todo material necessário.

Preparar uma mistura com os reagentes (mix) abaixo (exceto e amostra) e aplicar em tubos 0,2µL ou placa de 96 poços.

Adicionar a amostra em cada tubo ou poço.



8.1.1. Placa com 96 poços

Reagentes do Mix	Quantidade 1x*
Água ultrapurada**	3,7 µL
Buffer 5X (Save Money)	2 µL
Primer (3,3 µM)	1 µL
Big Dye	0,3 µL
Volume do Mix***	7 µL
Amostra (produto da PCR purificado)	3 µL
Volume Total do Mix	10 µL

*Quantidade para uma amostras - pode alterar conforme a quantidade de amostras.

**A água é o reagente que altera a quantidade para que o volume final do mix + amostra seja 10 µL.

*** Muda dependendo da quantidade de amostra utilizado.

8.1.2. Depois de colocar o mix e as amostras na placa, é necessário selar a placa com a fita seladora de placas de sequenciamento e levar a placa ao termociclador;

8.1.3. Introduzir os tubos no termociclador, programado para os seguintes ciclos de temperatura e tempo:

95°C	1 min	1X
95°C	15 seg	15X
55°C	10 seg	
60°C	1:15 min	
95°C	15 min	5X
55°C	10 seg	
60°C	1:30 min	
95°C	15 seg	5X
55°C	10 seg	
60°C	2min	
4°C	infinito	

8.2. Após terminar a reação no termociclador

8.2.1. Remover a placa do termociclador e encaminhar para a centrífuga por 2 minutos, 2000 RCF a 4°C;

Obs: A placa deve sempre estar envolvida com o papel alumínio, para evitar a luz.

8.2.2. Após a centrifugação, misturar na mesma proporção o EDTA 125mM e o acetato de sódio a 3M (ph 5,2). Adicionar em cada poço o EDTA e o acetato de sódio (1 µL de acetato + 1 µL de EDTA= 2 µL mix).

Ex: 700µL de EDTA e 700µL de acetato de sódio

8.2.3. Adicionar 25 µL de etanol 100% gelado a cada um dos poços;

8.2.4. Selar a placa com strips e misturar por inversão (4x) e misturar manualmente;

8.2.5. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo de luz e envolver a placa com papel alumínio;

8.2.6. Após o período de incubação centrifugar por 45 minutos a 4°C a 2000 RCF ou 3000 RCF por 30 minutos;

Importante: O próximo passo deve ser feito imediatamente. Se isto não for possível. Fazer um spin na placa por +2 minutos, antes de iniciar a próxima etapa.

8.2.7. Inverter a placa manualmente e fazer um spin até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida à placa da centrífuga;

Obs: A inversão desta placa deve ser manual, sobre a pia, com um só movimento rápido, para evitar contaminação dos poços. Com a placa invertida sobre o papel toalha bata delicadamente por 8X, para retirar o excesso de etanol e fazer um spin de 1 minuto.

8.2.8. Adicionar 35 µL de etanol a 70% em cada um dos poços;

Obs: Utilizar pipeta multicanal.

8.2.9. Centrifugar por 15 minutos a 4°C e 1650 RCF;

8.2.10. Inverter a placa manualmente e fazer um spin até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida à placa centrifuga;

Obs: A inversão desta placa deve ser manual, sobre a pia, com um só movimento rápido, para evitar contaminação dos poços. Com a placa invertida sobre o papel toalha bater delicadamente por 8X, para retirar o excesso de etanol e fazer um spin de 1 minuto.

8.2.11. Incubar a placa a 52°C por 15 minutos;

Obs: Cobrir a placa somente com papel alumínio em forma de cabana (no próprio termociclador com a tampa aberta).

Importante: Caso não for colocar a placa no sequenciador imediatamente, com a placa seca, colocar o selo, envolver com o papel alumínio para protegê-la da luz e congele.

8.2.12. Acrescentar em cada poço 10µL de formamida HI-DI, lavando as paredes dos poços. Selar e fazer um spin;

Obs: Tentar utilizar somente uma unidade de ponteira, de forma que não entre em contato com poço.

8.2.13. Aquecer a placa 95°C por 1 minuto e depois mais 1 minuto no gelo, em seguida enviar a placa para o sequenciador.

Obs: Sempre colocar a placa em par, pois os capilares fazem a leitura em par.

9. PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

Não se aplica

10. LIMITAÇÕES

Não se aplica

11. REFERÊNCIAS

1. Nonohay, JS; Hepp, D. Técnicas e análises de Biologia Molecular. Biotecnologia II. Capítulo 1, 1-23. Disponível em:

<http://srvd.grupoa.com.br/uploads/imagensExtra/legado/B/BRUNO_Alessandra_Nejar/Biotecnologia_II/Lib/Amostra.pdf>.

2. Silva, GAV; Ramasawmy, R; Boechat, AL, et al. Association of TNF à 1031 C / C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, Brazil. Human. Immunology. 2015;76, (2-3):137- 141.

12. ANEXOS

Não se aplica

8.6 Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS SURTOS DA DOENÇA DE CHAGAS NO ESTADO DO AMAZONAS

Pesquisador: DEBORA RAYSA TEIXEIRA DE SOUSA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 03164118.9.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.059.764

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25**Bairro:** D. Pedro I**CEP:** 69.040-000**UF:** AM**Município:** MANAUS**Telefone:** (92)2127-3572**Fax:** (92)2127-3572**E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

Página 06 de 07

MANAUS, 05 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))