

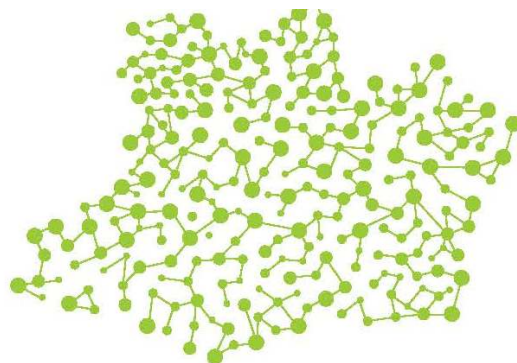


UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECIOSAS



**TRITOMÍNEOS DO AMAZONAS: INVASÃO DE DOMICÍLIOS,
INFECÇÃO NATURAL POR *Trypanosoma cruzi* TcI, TcII, TcIII e TcIV E
PERCEPÇÃO DA POPULAÇÃO SOBRE A INFECÇÃO CHAGÁSICA**

RUBENS CELSO ANDRADE DA SILVA JUNIOR



MANAUS
2019

RUBENS CELSO ANDRADE DA SILVA JUNIOR

**TRIATOMÍNEOS DO AMAZONAS: INVASÃO DE DOMICÍLIOS,
INFECÇÃO NATURAL POR *Trypanosoma cruzi* TcI, TcII, TcIII e TcIV E
PERCEPÇÃO DA POPULAÇÃO SOBRE A INFECÇÃO CHAGÁSICA**

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 Infecciosas*.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

MANAUS

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva Junior, Rubens Celso Andrade da

Triatomíneos do Amazonas: Invasão de domicílios, Infecção natural por *Trypanosoma cruzi* TcI, TcII, TcIII e TcIV e percepção da população sobre a infecção chagásica. Rubens Celso Andrade da Silva. - Manaus, 2019.

101f.:

Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Medicina Tropical – Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas

Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.

Inclui bibliografia

Orientador(a): Guerra, Maria das Graças Vale Barbosa

1. Triatomíneos 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Doença de Chagas 4. Região Amazônica. 5. Vulnerabilidade da população I. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Triatomíneos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, em ambientes domiciliares e a exposição da população à infecção chagásica em Manaus.

FOLHA DE JULGAMENTO

**TRITOMÍNEOS DO AMAZONAS: INVASÃO DE DOMICÍLIOS,
INFECÇÃO NATURAL POR *Trypanosoma cruzi* TcI, TcII, TcIII e TcIV E
PERCEPÇÃO DA POPULAÇÃO SOBRE A INFECÇÃO CHAGÁSICA**

RUBENS CELSO ANDRADE DA SILVA JUNIOR

“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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rubens Celso e Rosilene Sousa pelo aprendizado, amor e proteção em suas orações, além do apoio incondicional nessa trajetória.

À minha amada família que sempre me acolheu com fraternidade, minhas avós, tios e tias e principalmente meus irmãos.

À minha orientadora Professora Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra pelo auxílio e conselhos para meu crescimento profissional.

Ao Sr. Nelson Ferreira Fé, pelos ensinamentos de entomologia e amizade e histórias de vida.

À Gerência de entomologia e a todos os seus colaboradores, sempre uma grande família disposta a ajudar.

Ao grupo de pesquisa em doença de Chagas e Leishmania Dr. João Macias Frade, pelas oportunidades e ensinamentos.

À Suzan Simões pelo companheirismo e apoio durante todos esses anos.

Aos meus amigos de infância Jonas Leitão, Ely Felipe, Gustavo Branquinho, Cristian de Sousa, Herlian Nalber agradeço por essa amizade que será para a vida toda, sinto falta de vocês.

Aos meus amigos de faculdade Crislene Carvalho, Jéssica Rany, Sabrina Meireles, Ralyvan Araújo, Laís Garcia Eric Marialva e Suzyane Bindá pela amizade durante a graduação e compartilhamento de experiência nas etapas mais difíceis do mestrado.

À Universidade do Estado do Amazonas, pela formação acadêmica na graduação e pós-graduação.

À fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado pela estrutura para execução do projeto.

À Dona Conceição Tufic e Altariza Freitas da secretaria de Pós-graduação PPGMT pela disposição e paciência em nos orientar com os documentos, relatórios e atividades do programa.

Aos professores da UEA do curso de pós-graduação pela aprendizagem.

DECLARAÇÃO DE AGÊNCIAS FINANCIADORAS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pelos recursos e agilidade e comprometimento com seus bolsistas e colaboradores.

À CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior pelo fomento ao projeto

RESUMO

Os triatomíneos são insetos de grande importância na saúde pública por serem vetores de *Trypanosoma cruzi*. Vivem em colônias dentro ou próximo de residências ou em ambientes silvestres. Na Amazônia, onde há grande diversidade de espécies de animais, não há domiciliação desses insetos e nos últimos anos *tem* crescido o número de casos da doença de Chagas. Esse estudo teve como objetivo descrever em triatomíneos do estado do Amazonas: distribuição espacial, infecção natural, linhagem de *T. cruzi*, locais de registro, bem como investigar a percepção da população sobre a transmissão da doença de Chagas na região. Foram incluídos dados sobre triatomíneos entregues à gerência de entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, e dados secundários cedidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Amazonas sobre a ocorrência de triatomíneos em diferentes cidades do Estado do Amazonas. A taxa de infecção natural dos triatomíneos foi estimada utilizando técnicas biomoleculares e a genotipagem dos isolados de *T. cruzi* utilizando os genes da citocromo oxidase II (CoiI) e da Glicose-fosfato Isomerase (GPI). Foi feito ainda um inquérito sobre a percepção da população para a transmissão da doença de Chagas. Entre 2010 e 2019 um total de 483 triatomíneos foram registrados em 14 municípios do estado do Amazonas, e identificadas seis espécies, sendo *Rhodnius robustus* (78,88%) e *Panstrongylus geniculatus* (10,14%) as mais frequentes e Apuí no sul do Amazonas, o município de maior registro com 243/483 (50,31%) exemplares; 59 exemplares foram entregues na GENT/FMTHVD distribuídos entre *R. robustus* 27/59 (45,53%), *P. geniculatus* 18/59 (30,51%), *R. pictipes* 13/59 (22,03%) e *Eratyrus mucronatus* 1/59 (1,69%); 36/59 (61%) estavam infectados e foram detectadas as linhagens TcI, TcII, TcIII e TcIV. Foram aplicados 221 questionários em moradores de seis bairros da cidade de Manaus, 184 (83,25%) moram em até 50 metros de fragmentos florestais; 92% já tinham ouvido falar da doença, 139 (62,90%) não conheciam nenhuma das formas de transmissão do *T. cruzi* ao homem ($p = 0,001$); 34/221 (15,38%) afirmaram ter encontrado barbeiros no interior de suas residências. *T. cruzi* TcII foi registrada pela primeira vez nesse estado. Os dados aqui apresentados reforçam a importância da vigilância epidemiológica, e do monitoramento desses vetores, particularmente na Amazônia. Ações de educação e inclusão da vigilância participativa comunitária devem ser utilizadas como forma de orientar a população para as medidas de prevenção da doença

Palavras Chaves: Vigilância entomológica. DTU. Invasão de domicílios. Barbeiros.

ABSTRACT

Triatomines are insects of great importance in public health because they are vectors of *Trypanosoma cruzi*. They live in colonies inside or near homes or in wild environments. In the Amazon, where there is a great diversity of animal species, there is no domiciliation of these insects and in recent years the number of cases of Chagas disease has grown. This study aimed to study spatial distribution, detect natural infection, identify *T. cruzi* lineage in triatomines found in residences in the state of Amazonas, as well as investigate the population's perception of the transmission dynamics of Chagas disease in the region. We included data on triatomines delivered to the entomology laboratory of the Dr. Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation, and secondary data provided by the Amazonas Health Surveillance Secretariat (FVS) on the occurrence of triatomines in different cities of the state of Amazonas. The natural infection rate of triatomines was estimated using biomolecular techniques and genotyping of *T. cruzi* isolates using the cytochrome oxidase II (CoxII) and Glucose phosphate Isomerase (GPI) genes. A survey was conducted on the population's perception of Chagas disease transmission. Between 2010 and 2019 a total of 483 triatomines were recorded in 14 municipalities of the Amazonas state, and six species were identified. *Rhodnius robustus* (78.88%) and *Panstrongylus geniculatus* (10.14%) were the most common; Apuí in southern Amazonas, the largest municipality with 243/483 (50.31%) specimens; 59 specimens were delivered to GENT / FMTHVD distributed among *R. robustus* 27/59 (45.53%), *P. geniculatus* 18/59 (30.51%), *R. pictipes* 13/59 (22.03%) and *Eratyrus mucronatus* 1/59 (1.69%); 36/59 (61%) were infected and *T. cruzi* TcI, TcII, TcIII and TcIV strains were detected. 221 questionnaires were administered to residents of Manaus, 184 (83.25%) live within 50 meters of forest fragments; 92% had heard of the disease, 139 (62.90%) did not know any forms of transmission of *T. cruzi* to man ($p = 0.001$); 34/221 (15.38%) said they had found triatomine inside their homes. The data presented here reinforce the importance of epidemiological surveillance and monitoring of these vectors, particularly in the Amazon. *T. cruzi* TcII was first recorded in this state. Education actions and inclusion of community participatory surveillance should be used as a way of orienting the population towards disease prevention measures.

Key words: Entomological surveillance. DTUs. Household invasion. Kissing bugs.

RESUMO LEIGO

Na Amazônia existem várias doenças transmitidas por insetos, as mais conhecidas são malária, leishmaniose e dengue. Entretanto, muitas pessoas não sabem que a doença de Chagas é transmitida por triatomíneos, mais conhecidos como barbeiros, e as que sabem associam ao consumo do açaí. Em várias regiões brasileiras esses insetos vivem dentro das casas, formando colônias. Entretanto, na região Amazônica eles vivem nas áreas de florestas, podendo entrar nas casas, atraídos pela luz. Esse trabalho apresenta informações sobre esses insetos, coletados durante dois anos por moradores de várias cidades do estado. Foram recebidos no Laboratório de entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, 59 barbeiros procedentes de seis municípios, destes, 61% estavam contaminados com o parasito *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Foram feitas perguntas aos moradores de seis bairros da cidade de Manaus que encontraram barbeiros nas suas residências, a maioria tem suas casas construídas próximo de florestas; já tinham ouvido falar da doença de Chagas, mas não conheciam nenhuma das formas de transmissão da doença para o homem. Os dados aqui apresentados reforçam a importância da vigilância e do monitoramento desses insetos na Amazônia. Ações de educação e inclusão participativa da comunidade devem ser utilizadas como forma de orientar a população para as medidas de prevenção da doença

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO

Figura 1: Ciclo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
Figura 2: Distribuição das linhagens de <i>T. cruzi</i>	2
Figura 3: Ciclo de desenvolvimento biológico de <i>Rhodnius robustus</i>	4
Figura 4 Distribuição geográfica de triatomíneos.....	5

ARTIGO

Figura 1: Municípios do Estado do Amazonas com registro de triatomíneos.....	38
Figura 2: Imagem Landsat de Manaus e Iranduba, com destaque para os pontos de coleta dos triatomíneos e respectivas linhagens de <i>T. cruzi</i>	40
Figura 3: Análise do fenograma dos isolados de <i>T. cruzi</i>	41

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1: Nome das espécies de triatomíneos coletados e recebidos na Gento/FMTHVD, por local de registro, taxa de infecção e linhagem de <i>T. cruzi</i> detectada.....	55
Tabela 2: Perfil epidemiológico dos entrevistados.....	57
Tabela 3: Descrição da percepção da população sobre Triatomíneos e a doença de Chagas.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDAS

CDC	Center for Disease Control and Prevention
COII	Citocromo Oxidase Subunidade II
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTU	Discrete Typing Units
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FMTHVD	Fundação de medicina tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
GENTO	Gerência de Entomologia
GPI	Glicose-fosfato Isomerase
HAI	Hemaglutinação Indireta
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFI	Imunofluorescência Indireta
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
NDVI	Normalized Difference Vegetation Index
NNN	Novy-Macneil-Nicolle
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
Ph	Potencial hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão
RNA	Ácido Ribonucleico
T. cruzi/Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UV	Ultravioleta
mL	Mililitro
µl	Microlitro
°C	Graus Celsius
g	Gramma

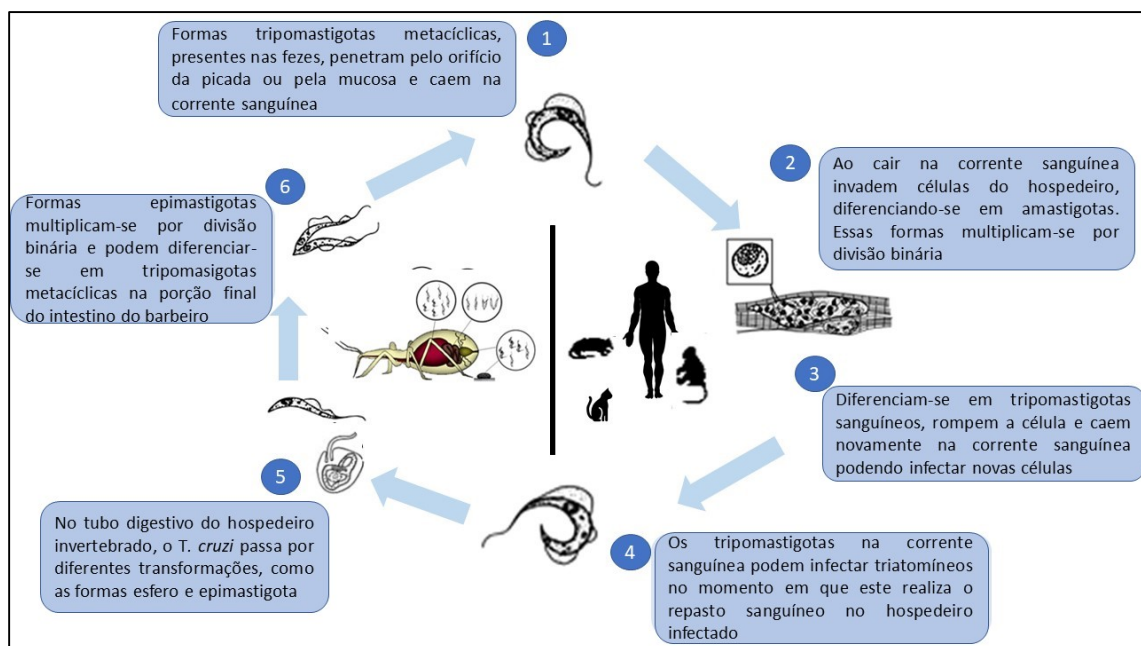
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2. Triatomíneos	2
1.3. Ciclo biológico	3
1.4. Distribuição espacial de triatomíneos	4
1.5. Habitat e importância epidemiológica de triatomíneos	5
1.6. Triatomíneos – Amazônia	7
1.7. Ciclo de Transmissão do <i>T. cruzi</i> na Amazônia	8
1.8. Exposição da população	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. Geral	11
2.2. Específicos	11
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	12
Triatomíneos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> TcI, TcII, TcIII e TcIV encontrados no intra e peridomicílio, em áreas urbanas e rurais do Amazonas	12
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS	44
5. CONCLUSÃO	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7. ANEXOS	54
7.1. Anexo II	93
7.2. Anexo III	95
7.3. Anexo IV	97
7.4. Anexo V	99
7.5. Anexo VI	101

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trypanosoma cruzi*

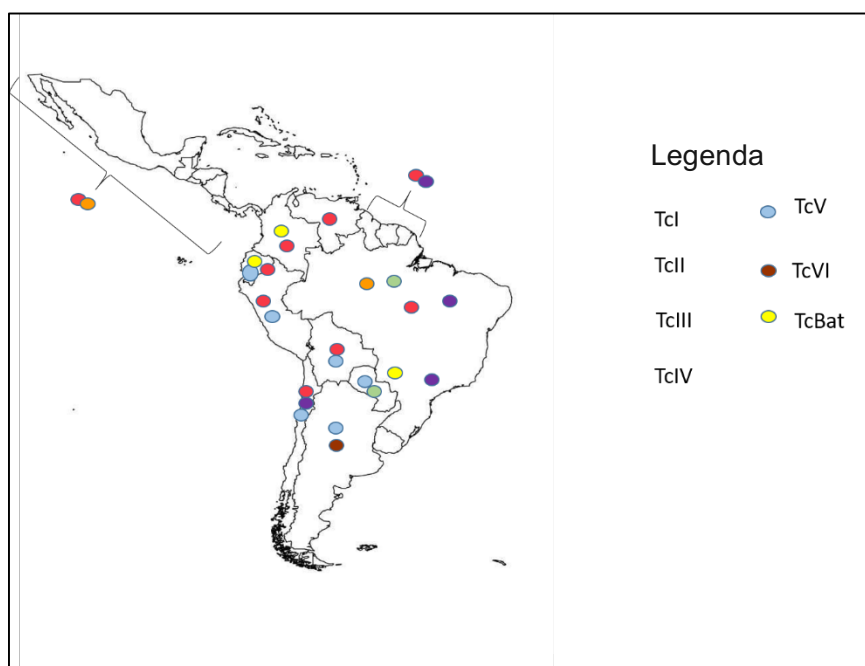
O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário de grande importância em saúde pública por ser o causador da doença de Chagas (DC). É um parasito digenético, que necessita obrigatoriamente realizar uma fase do seu ciclo biológico (Figura 1) no intestino de várias espécies de insetos - triatomíneos, e outra em mais de 140 espécies de mamíferos, incluindo-se o homem, onde causa a doença de Chagas humana, que pode representar uma condição infecciosa, com fase aguda ou crônica, de ampla distribuição na América Latina. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a DC como uma enfermidade negligenciada. Estima-se que existam aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas no mundo e que 75 milhões estão sob risco de contrair a doença, e com 10 mil mortes anualmente (1–3).



Fonte: Adaptado de CDC, SILVA JUNIOR, RCA

Figura 1: Ciclo do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e invertebrados

Devido a sua complexa heterogeneidade, o *T. cruzi* pode ser caracterizado, por meio de marcadores moleculares, em linhagens, denominadas de DTU (Unidade Discreta de Tipagem), que classificam a espécie em seis grupos distintos (*T. cruzi* I–VI e Tc Bat) que estão amplamente distribuídas na Américas (Figura 2). Cada ponto representa o registro de ocorrência das linhagens em cada país; observa-se a ocorrência das linhagens TcI, TcIII e TcIV no bioma amazônico (4,5).



Fonte: SOUSA, DRT.

Figura 2: Distribuição das linhagens de *T. cruzi* nas Américas

1.2. Triatomíneos

Os triatomíneos são insetos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Estão classificados em cinco tribos, 18 gêneros e 152 espécies. No Brasil são registradas 66 espécies, das quais cerca de 10 são epidemiologicamente importantes, com maior ou menor grau de participação na transmissão da doença de Chagas (3,6,7). Essa relação foi descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas, em 1907, em Lassance, estado de Minas Gerais, durante um trabalho de combate à malária. Nesta ocasião, que foi

alertado para a presença de um inseto hematófago, no interior das habitações humanas, chamado vulgarmente de “barbeiro” (8).

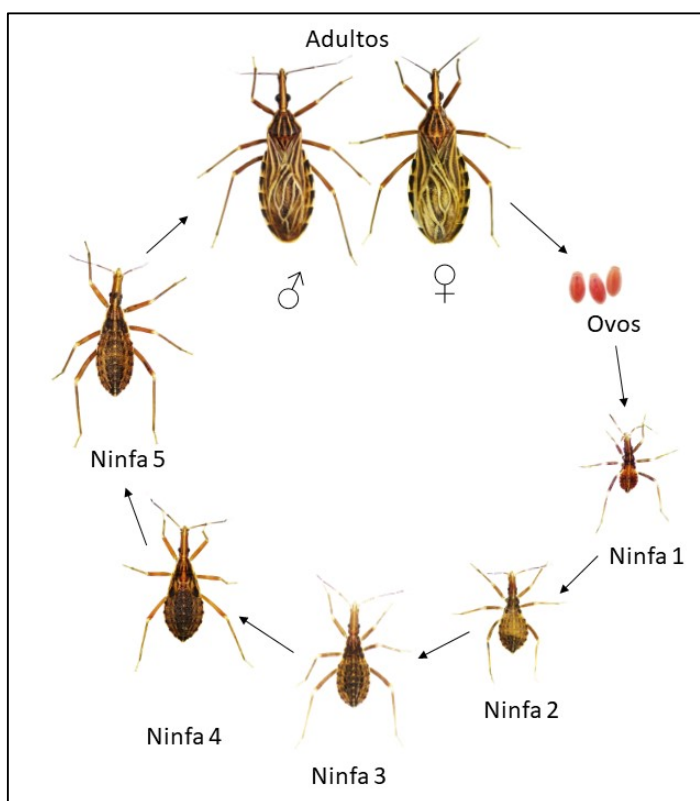
Diferente de outros insetos hematófagos, como os mosquitos e flebótomos, nos quais apenas a fêmea se alimenta de sangue, os triatomíneos (tanto machos quanto fêmeas em qualquer fase de seu ciclo de vida) se alimentam de sangue e podem se infectar de forma permanente, ao ingerir sangue de um mamífero infectado com o *T. cruzi* (3).

A capacidade vetorial das diferentes espécies depende de um maior grau de antropofilia e metaciclogênese (produção de um maior número de formas infectantes de *Trypanosoma cruzi*), e de um menor tempo entre repasto sanguíneo e dejeção (9). Algumas espécies se tornam potenciais transmissores do *T. cruzi*, sob certas circunstâncias, onde os parasitos podem chegar até o sangue de um hospedeiro susceptível (podendo ser qualquer mamífero), especialmente através de pequenos ferimentos cutâneos ou do epitélio das mucosas conjuntival ou oral (10,11). Contudo, somente algumas espécies se tornam vetores efetivos, ou seja, as espécies que defecam durante ou logo após a alimentação; outras, no entanto, defecam após abandonar a fonte de alimento, longe do local da sucção. Este fato classifica as diferentes espécies de acordo com sua capacidade vetorial na transmissão da doença (12).

1.3. Ciclo biológico

Classificados como insetos hemimetábolos (desenvolvimento incompleto), durante seu ciclo de vida os triatomíneos passam por diferentes fases, que compreendem desde ovo até o adulto (Figura 3). Na fase imatura apresentam cinco estádios, semelhantes aos adultos, entretanto nessa fase não estão aptos a voar e a reproduzir-se (12). Possuem grande capacidade de reprodução, vivem em média entre um a dois anos, e podem ter intensa resistência ao jejum, como o *Rh. stali* em que, em condições de laboratório, teve uma sobrevida maior que 70 dias sem alimentação(13).

O repasto sanguíneo é fundamental para que ocorra seu desenvolvimento, isto é, sem alimentação as ninfas farão no máximo uma ecdise (muda). Assim, a tolerância destes insetos ao jejum é muito grande, porém, quando esta ocorre, logo a seguir a muda volta a acontecer normalmente (3).

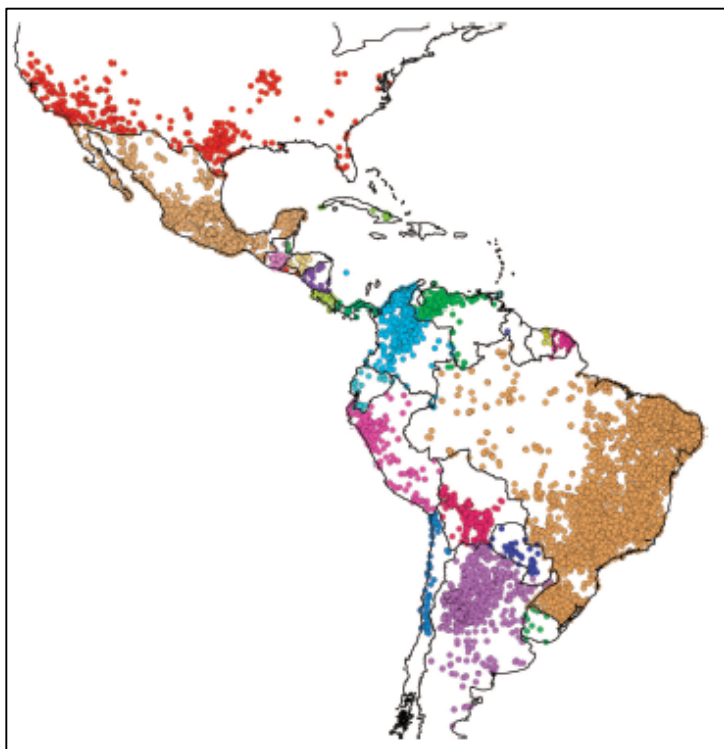


Fonte: Acervo pessoal

Figura 3: Representação do ciclo de desenvolvimento biológico de *Rhodnius robustus*.

1.4. Distribuição espacial de triatomíneos

A distribuição dos triatomíneos, vetores (ou potencialmente vetores) da doença de Chagas, abrange uma área com a ocorrência registrada de infecção humana autóctone desde o sul dos Estados Unidos até a Província de Chubut na Argentina (Figura 3) (6,14,15).



Fonte: Cecarelli, S. 2018

Figura 3 - Distribuição geográfica de triatomíneos nas Américas

1.5. Habitat e importância epidemiológica de triatomíneos

Os triatomíneos habitam preferencialmente os ambientes silvestres, ninhos de gambás, tocas de tatu, entre outros, apresentando preferência por abrigos em pedras, tocas de animais no solo e palmeiras (6).

Para associar uma espécie a um ecótopo é necessário o encontro de espécimes em diferentes estágios de desenvolvimento, coabitando o mesmo ambiente. Os triatomíneos mais estudados são aqueles associados a ecótopos artificiais, especialmente os domicílios, representando uma pequena parcela do universo de espécies conhecidas. O encontro esporádico de um ou poucos espécimes em determinado ecótopo não é suficiente para se afirmar que a espécie apresenta aquele ambiente como o seu ecótopo. O encontro, especialmente de adultos, em um ecótopo pode tratar-se simplesmente de invasão (6).

Embora sejam insetos com pequena capacidade de dispersão pelo voo, diante das pressões antrópicas, tais como os desmatamentos, queimadas e outras agressões ecológicas, que destroem seus habitats naturais, se os hospedeiros se tornarem escassos, eles podem fazer longos voos para atingir um novo habitat (16), durante os quais mostram uma atração especial por luzes artificiais. Do ponto de vista epidemiológico, essa atração para a luz desempenha um importante papel na chegada de triatomíneos às habitações humanas (17).

Nesse processo, espécies que podem colonizar o peri e intradomicílio, passam a se alimentar do sangue de animais domésticos e do homem, representando risco de instalação da Tripanossomíase domiciliar. Quando existe uma convivência estreita entre as pessoas e os triatomíneos infectados, a transmissão vetorial pode ser mais frequente, se tornando comum em moradias infestadas por populações domiciliadas (sinantrópicas) de vetores (18).

As possibilidades de invasão domiciliar ativa, com subsequente colonização, constituem fenômenos ainda não bem conhecidos, provavelmente, devido às dificuldades em avaliar e evidenciar a entrada desses insetos nas casas, assim como verificar a capacidade desses triatomíneos deslocarem-se dos ecótopos naturais para as habitações humanas, bem como de um domicílio para outro (19). Nas grandes áreas endêmicas a domiciliação de algumas espécies silvestres ocorreu em razão das crescentes mudanças, ocorridas no ambiente natural, após invadirem e se instalarem no ambiente ocupado pelo homem (20).

O mais importante vetor domiciliado no Brasil foi *Triatoma infestans*, espécie restrita a ambientes humanos, eliminada por meio de um extenso programa de controle iniciado na década de 70, baseado na identificação e borrifação de domicílios infestados. Em 2006 a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) certificou o Brasil, como um país livre de transmissão vetorial nas áreas endêmicas (21).

Outras espécies tais como *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius neglectus*, *T. sordida*, *T. pseudomaculata* e *T. maculata*, que são

melhores adaptadas a ambientes artificiais no país, são potenciais vetores de DC. Essas espécies são nativas, o que significa que mantêm populações silvestres com capacidade de infestar domicílios tratados com inseticidas nas suas áreas de ocorrência e se tornarem domiciliadas no lugar de *Triatoma infestans* (18).

De maneira geral, durante muito tempo, em todo o território brasileiro se registrou infestação de domicílios por triatomíneos, excluindo-se a região Norte, na distribuição da transmissão domiciliada da tripanossomíase americana (22).

Do ponto de vista epidemiológico as espécies de triatomíneos podem ser classificadas em diversas categorias:

- a) habitualmente domiciliadas;
- b) frequentemente domiciliadas;
- c) ocasionalmente domiciliadas;
- d) frequentemente ou ocasionalmente peridomiciliadas;
- e) habitualmente silvestres;
- f) habitats desconhecidos, encontrados esporadicamente atraídos pela luz.

Algumas espécies podem ser encontradas em mais de uma categoria, tanto em ambientes domiciliar e peridomiciliar quanto no meio silvestre, como no caso de *Rhodnius prolixus* (6).

1.6. Triatomíneos – Amazônia

Na Amazônia há registros de pelo menos 25 espécies de triatomíneos silvestres, das quais em 10, presentes nos mais variados ecótopos, já foram encontradas infectadas com formas flageladas de *T. cruzi*. A Amazônia apresenta peculiaridades, distintas das áreas originalmente de risco para transmissão vetorial da doença de chagas - DC no país (23,24).

Diferente das áreas endêmicas, na região amazônica não há registro de vetores que colonizem o domicílio, com exceção de um único encontro de colônia de *Panstrongylus geniculatus* na ilha de Marajó no Pará e de *Triatoma maculata* em Boa Vista – Roraima. Todas as espécies de triatomíneos encontradas, tem

hábitos silvestres, essencialmente zoófilos, com pequena capacidade de dispersão pelo voo. A principal forma de transmissão de *T. cruzi* ocorre por via oral, sendo considerada como mecanismo primário, em especial no ciclo silvestre, por apresentar caráter habitual no ciclo enzoótico primitivo do *T. cruzi*, (ingestão de vetores infectados) por mamíferos susceptíveis (25–27).

Teixeira e colaboradores (28) descrevem uma rede trófica completa compreendendo diferentes espécies que habitam os microhabitats de palmeiras. Estes incluem famílias distintas de insetos (incluindo triatomíneos), anfíbios, pássaros e marsupiais, como *Didelphis marsupialis*, um reservatório silvestre do *T. cruzi*. No estado do Pará a importância das palmeiras na ecologia de triatomíneos silvestres foi demonstrada por Ricardo-Silva e colaboradores (29).

Segundo Abad-Franch e colaboradores (30), seis espécies do gênero *Rhodnius* estão associadas à micro-habitat de palmeiras, e o principal fator limitante da completa endemização da doença de Chagas na Região Amazônica está representado pela incapacidade de adaptação de espécies procedentes das áreas endêmicas, e ausência de espécies de triatomíneos com grande potencial de domiciliação.

1.7. Ciclo de Transmissão do *T. cruzi* na Amazônia

O risco da infecção chagásica para as populações amazônicas se relaciona com um conjunto complexo de determinantes biológicos ligados à grande diversidade de hospedeiros silvestres do *T. cruzi* (marsupiais, morcegos, roedores, edentados, carnívoros, primatas, etc.) vetores (mais de 25 espécies) e fatores socioeconômicos (extrativismo, lazer etc.) resultando em intensos ciclos de transmissão silvestre (23).

No Amazonas, a infecção natural por *T. cruzi* pode ser encontrada em cerca de 30-50% dos vetores coletados em ambiente silvestre, com predominância das espécies *Rhodnius pictipes*, *R. robustus* e *Panstrongylus geniculatus* (31,32). A linhagem TcI tem sido associada a hospedeiros invertebrados (triatomíneos silvestres), hospedeiros vertebrados silvestres e casos humanos com

diagnóstico da doença aguda (infecção por transmissão vetorial) ou crônica (sem identificação do tipo de transmissão) (33–35). Por outro lado, a linhagem TcIV tem sido descrita em casos humanos agudos, com infecção por via oral (35).

1.8. Exposição da população

A degradação do ambiente natural, utilização de luz artificial, entre outros, promove o deslocamento de triatomíneos de seus ecótopos silvestres para ambientes em que há presença de humanos, tornando-se motivo de preocupação para os riscos de transmissão da DC (25,28).

A proximidade descontínua de triatomíneos com o ser humano tem incentivado estudos de avaliação e monitoramento sistemático para a possibilidade de domiciliação de vetores de DC na Amazônia. As técnicas a serem aplicadas nas buscas por melhor conhecer a dinâmica bioecológica e de ocorrência de triatomíneos na Amazônia devem obedecer a métodos diferentes e aplicáveis a cada ambiente no que diz respeito à investigação de vetores, por tratar-se de uma região distinta das demais regiões brasileiras (2).

A ocupação humana na Amazônia inclui atividades relacionadas a desmatamento e urbanização, o que têm alterado os habitats das diferentes espécies, afugentando os animais e expondo a população humana ao contato com triatomíneos. Nos últimos anos, tem sido cada vez mais frequente o recebimento de exemplares de triatomíneos, no laboratório de entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado-FMTHVD, doados por pessoas que os encontraram no intradomicílio de apartamentos recém habitados, construídos muito próximo a áreas, com vegetação característica dos ecótopos de triatomíneos silvestres. Além disso, os habitantes desses locais podem não conhecer o ciclo de transmissão da doença de Chagas e a participação de insetos vetores nesse ciclo.

Embora tenha sido descoberta por Carlos Chagas em 1909, nos dias atuais, a doença de Chagas ainda se constitui em um problema de grande impacto sócio-econômico-cultural. Nas últimas décadas a DC tem se dispersado

amplamente para outros continentes e sua ocorrência na Amazônia brasileira, vem causando preocupação devido às diferenças na dinâmica de transmissão do parasito ao homem. Nessa região a maioria dos registros de transmissão do *T. cruzi* ao homem, ocorreu de maneira esporádica e circunstancial, mas nos últimos anos tem aumentado o registro do número de casos com indicação de transmissão da doença por meio de alimentos contaminados com o parasita (36,37).

A investigação da taxa de infecção natural em triatomíneos infectados pelo *T. cruzi* e a avaliação do conhecimento da população sobre a doença e seus vetores pode contribuir de maneira significativa na compreensão da dinâmica de transmissão e redução do contato das pessoas com o *T. cruzi*. No caso dos triatomíneos da Amazônia, são de grande relevância estudos que investiguem a ocorrência desses insetos próximos ou dentro dos domicílios, considerando que nessa região ainda não há colonização desses insetos, e a população pode não ter conhecimento sobre o papel dos triatomíneos na transmissão da doença de Chagas. É importante que a população seja orientada e entenda que, em ambientes com alteração ambiental, há dispersão de vetores.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar em triatomíneos coletados dentro e fora do domicílio no Amazonas, a taxa de infecção por diferentes linhagens de *Trypanosoma cruzi*, e a percepção da população sobre a infecção chagásica em Manaus

2.2. Específicos

Demonstrar a frequência de triatomíneos no intra e peridomicílio;

Estimar a taxa de infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos coletados no intra e peri domicílio em Manaus;

Identificar as linhagens de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos coletados no intra e peri domicílio;

Conhecer aspectos da percepção da população sobre o envolvimento de Triatomíneos na transmissão da doença de Chagas.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

Os resultados dessa dissertação serão apresentados em formato de artigo. O detalhamento da metodologia está descritos nos procedimentos operacionais padrão anexados no final da dissertação.

Proposta de título para o artigo:

Triatomíneos infectados com *Trypanosoma cruzi* TcI, TcII, TcIII e TcIV encontrados no intra e peridomicílio, em áreas urbanas e rurais do Amazonas

Triatomíneos infectados com *Trypanosoma cruzi* TcI, TcII, TcIII e TcIV encontrados no intra e peri domicílio, em áreas urbanas e rurais do Amazonas

Rubens Celso Andrade da Silva Junior¹, Emily de Sousa Moura², Debora Raysa Teixeira de Sousa¹, Laylah Kelre Costa Magalhães¹, Kenny Rodrigues de Sousa¹, Jessica Vanina Ortiz¹, Arineia da Silva Soares¹, Katia Couceiros¹, Nelson Ferreira Fé², Erica Cristina Chagas³, Suzan Simões Vieira², Jorge Augusto de Oliveira Guerra², Maria das Graças Vale Barbosa Guerra^{1,2}

Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Fundação de Vigilância em Saúde

Resumo

Triatomíneos são insetos hematófagos que vivem em colônias, próximos a sua fonte alimentar (vertebrados). A maioria das espécies vivem em ecótopos silvestres e têm ampla distribuição nas Américas, com pequena capacidade de dispersão pelo voo. Entretanto, diante das pressões antrópicas, podem fazer longos voos, terem atração por luz artificial e invadir domicílios. Têm grande importância na saúde por serem vetores de *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. Na Amazônia, embora não haja triatomíneos domiciliados, tem crescido o número de casos da doença. Este estudo teve como objetivo detectar a infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos encontrados no intra e peridomicílio em áreas urbanas e rurais e investigar o nível de conhecimento da população sobre a dinâmica de transmissão da doença de

Chagas no estado do Amazonas. Foram analisados triatomíneos entregues por moradores no Laboratório de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado -GENTO/FMTHVD. A investigação de infecção natural e linhagens de *T. cruzi* nos triatomíneos foi realizada utilizando-se técnicas biomoleculares e a genotipagem dos isolados de *T. cruzi* fazendo-se uso dos genes da Citocromo oxidase da subunidade II (COII) e da Glicose-fosfato Isomerase (GPI). Foram recebidos 59 espécimes de triatomíneos procedentes de seis municípios do estado, a maioria de Manaus, 23 triatomíneos foram recebidos vivos. Identificou-se quatro espécies, *R. robustus* foi a mais frequente 27/59 (45,53%); 36/59 (61%) estavam infectados e foram identificadas as linhagens de *T. cruzi* TcI, TcII, TcIII e TcIV; *P. geniculatus* a apresentou infecção com todas as linhagens identificadas. Foram realizadas visitas e aplicados 221 questionários entre as pessoas que entregaram os triatomíneos no laboratório, seus familiares e vizinhos; 184 (83,25%) moram em residências com distância de até 50 metros da borda de fragmentos florestais; 92% já tinham ouvido falar da doença de chagas, 139 (62,90%) não conheciam as formas de transmissão ($p = 0,001$); após o período de aplicação dos questionários foram entregues no laboratório 15 triatomíneos, 9/15 (60%) estavam infectados com *T. cruzi*. Nesse estudo registra-se pela primeira vez *T. cruzi* TcII nesse estado e TcIII e TcIV em triatomíneos coletados dentro do domicílio. Reitera-se a importância da vigilância entomológica, para monitoramento desses vetores na Amazônia. Recomenda-se intensificação nas ações de educação e inclusão da participação comunitária como alternativas nas medidas de prevenção da doença.

Palavras chaves: Infecção chagásica. DTU. Amazônia. Vetores. GPI. COII.

INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário de grande importância em saúde pública por ser o agente etiológico da tripanossomíase Americana, mais conhecida como doença de Chagas (1,2). É um parasito eclético, de ciclo biológico heteroxênico, realizado em várias espécies de invertebrados (insetos triatomíneos) e vertebrados (mamíferos). Em razão da necessidade de adequação aos diferentes hospedeiros (3), o *T. cruzi* apresenta uma variabilidade genética, sendo atualmente classificado, por meio de marcadores moleculares em distintas linhagens (*T. cruzi* I–VI e Tc Bat), amplamente distribuídas na Américas denominadas de DTUs (Unidade Discreta de Tipagem) (4,5).

Os triatomíneos são insetos, da ordem hemiptera, são conhecidas 152 espécies, distribuídas em regiões tropicais e intertropicais e três gêneros têm grande importância epidemiológica na saúde pública: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (6–8). No Brasil já foram registradas 66 espécies e destas pelo menos 10 são epidemiologicamente importantes, devido suas características comportamentais (9–11). Por serem hematófagos habitam diferentes ecótopos, onde sua fonte alimentar esteja disponível, formando colônias e podem ser encontrados dentro de domicílios, em seus anexos, mas a maioria vive em ambientes silvestres (ninhos de pássaros toca de animais, palmeiras entre outros) (12–14).

Na Amazônia, as espécies são silvestres, entretanto, *P. geniculatus* e *R. robustus* (14), já foram encontrados no interior de residências, principalmente

em áreas com forte antropização, (15–18). Nessa região, por não colonizarem os domicílios, a população não os conhece e não os associa ao ciclo de transmissão do *T. cruzi* para o homem (9,19). Nesse contexto, medidas de educação em saúde, são importantes, uma vez que nessas circunstâncias a transmissão vetorial pode acontecer. Esse trabalho tem como objetivos detectar a infecção natural e identificar a linhagem de *T. cruzi* em triatomíneos encontrados em residências no estado do Amazonas bem como investigar o nível de conhecimento da população sobre a dinâmica de transmissão da doença de Chagas na região.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tipo e local de estudo - Estudo descritivo, realizado a partir de registros de triatomíneos em ambientes domiciliares e peridomiciliares por moradores de seis municípios do Amazonas. O estado está localizado na região Norte do Brasil, tem uma área territorial de 559.168,117 km², distribuída entre 62 municípios, cuja capital é Manaus. Em 2019 estimou-se uma população de 4.144.597 habitantes, e uma densidade demográfica de 2,23 hab/km. Esse estado está inserido no bioma amazônico, tem registrado desde 1977 casos de doença de Chagas, e ocorrência de triatomíneos silvestres (20,21).

Estudo dos triatomíneos - Os triatomíneos avaliados foram recebidos (vivos ou mortos) na Gerência de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado - GENTO/FMTHVD, a partir de duas fontes: 1) moradores da Região Metropolitana de Manaus à Gerência de

Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado; 2) Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas.

Procedimentos relacionados aos triatomíneos e investigação de infecção natural por *T. cruzi*

Os exemplares os triatomíneos foram identificados usando-se chave dicotômica de Lent & wingodinzisk (22). Os que foram entregues vivos tiveram suas fezes analisadas para evidencia de formas flageladas através de exame à fresco. Os exemplares entregues mortos foram armazenados em microtubos de 1.5 ml e acondicionados em freezer a -20°C, para posterior investigação de infecção natural por *T. cruzi* utilizando técnicas biomoleculares para a extração de DNA.

Exame a fresco - O exame a fresco foi realizado retirando o conteúdo intestinal do triatomíneo. O conteúdo foi lavado com uma solução de soro fetal bovino e gentamicina, 200 µL foram separados para extração de DNA e 10µL foram colocados em lâmina para investigação de formas flagelares idênticas ao *T. cruzi*, sob microscópio óptico em objetiva de 40x.

Extração de DNA - A extração de DNA foi feita utilizando kit de extração Invitrogen, PureLink™ Genomic DNA kit (utilizando protocolo tissue lysat), com algumas modificações. Foram utilizados 200µL de solução homogeneizando do conteúdo intestinal e/ou ¼ do vetor, seguindo recomendações do fabricante.

Amplificação de DNA do gene mini-exon - O DNA foi amplificado utilizando o espaço não transcrito do gene mini-exon seguindo protocolo estabelecido (23). O processo de amplificação foi realizado com uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; e extensão final de 72°C por 10

minutos. O produto amplificado foi analisado em eletroforese em gel de agarose a 2% preparado com brometo de etídio. O produto de 100 pb (pares de base) é caracterizado como *T. rangeli*; 150 pb caracterizam *T. cruzi* Zimodema 3, para as DTUs TcIII ou TcIV; 200pb caracteriza *T. cruzi*, tcl e 250 pb caracteriza *T. cruzi* TcII.

Amplificação de DNA do gene que codifica a subunidade II da Citocromo Oxidase - A amplificação do gene Coll através da análise do polimorfismo nos comprimentos de fragmentos de restrição (FRLP) foi realizada seguindo protocolos de Freitas e colaboradores (24). Foram utilizados os iniciadores TcMit 31 e TcMit 40 que amplificam fragmentos de aproximadamente 400 pb. As condições de amplificação foram de acordo com Santana e colaboradores (25).

Amplificação de DNA do gene da Glicose-Fosfato Isomerase (GPI) - A amplificação deste gene foi feita seguindo o protocolo proposto por Gaunt e colaboradores (26). Usando os iniciadores gpi.for (59CGCACACTGGCCCTATTATT) e gpi.rev (59TTCCATTGCTTTCCATGTCA). As condições de amplificação foram de acordo com Monteiro e colaboradores (27).

Purificação e análise dos genes - Os produtos das PCR's Coll e GPI foram purificadas utilizando polietilenoglicol (PEG). As amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 ml juntamente com o PEG, na proporção de 1:1, incubada a 37°C por 10 minutos e centrifugada a 6.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente, após é retirado o sobrenadante e acrescentado 125µL de etanol 80%, por fim o etanol é descartado e a amostra incubada a 60°C por

10 minutos para remoção de resíduos de álcool, e ressuspendida com um volume da água ultra pura e armazenada a -20°C.

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit BigDye Terminator™ 3.1 (Applied Biosystems) seguindo recomendações da fabricante. As amostras foram processadas no Applied Biosystems® 3130/3130xl Genetic Analyzers. As sequências foram validadas criando sequencias consenso e pareadas com sequências de referência depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

As seguintes cepas de referência foram utilizadas: TcI (Silvio ×10 cl4), TcII (Esmeraldo cl3), TcIII (M6241 cl6), TcIV (CANIII cl1), TcV (Mn cl2), e TcVI (CL Brener). A árvore filogenética foi construída usando o método “neighborjoining”, através do programa MEGA-X (v. 10.0.5) com base em 1500 réplicas.

A taxa de infecção natural por *T. cruzi* foi estimada dividindo-se o número de triatomíneos positivos pelo número total observados, multiplicando por 100.

Percepção da população sobre DC

Para medir o conhecimento da população sobre DC foi aplicado um questionário semiestruturado com perguntas fechadas, sobre a doença de Chagas e seus vetores, hábitos alimentares da população, aplicado aos familiares e a vizinhança dos doadores dos triatomíneos ou em locais onde houve registros de triatomíneos, e que tivesse pelo menos um morador com idade acima de 18 anos.

Após aceite e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi preenchimento um questionário, cada morador recebeu um folder

educativo contendo informações sobre a doença, vetores e o que fazer ao encontrar esses insetos em sua residência. Depois o morador foi convidado a continuar participando do estudo, colaborando através da vigilância entomológica participativa, caso houvessem novas ocorrências de triatomíneos em sua casa.

Análises de Dados

Os registros de ocorrência de triatomíneos foram compilados em planilha do Excel e analisados em softwares.

Distribuição espacial - Os mapas foram confeccionados usando base de dados do estado do Amazonas disponíveis no site do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), utilizando o sistema de informação geográfica Quantum gis (v. 2.18 las palmas). O Normalized Difference Vegetation Index (NDVI), foi utilizado para avaliar a cobertura vegetal dos fragmentos de mata na área urbana de Manaus e Iranduba. O cálculo do índice foi feito a partir dos espectros das imagens de satélite LANDSAT 8 disponíveis no site do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) (20,28).

Análise estatística - A análise das frequências de triatomíneos e variáveis socioeconômicas de conhecimento sobre a DC foi realizada utilizando software STATA 13 (v. 13.0). Foi realizada ainda a comparação entre os grupos de triatomíneos coletados no intra e peridomicílios e também para comparar os grupos de pessoas entrevistadas. Foi utilizado o teste de χ^2 de Pearson considerando $p < 0,05$ para análise das frequências.

Aspectos éticos

Este estudo fez parte de um projeto maior submetido e aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa com humanos da FMTHVD CAAE: 96950118.5.0000.0005 sob título: Triatomíneos do estado do Amazonas: distribuição espacial, bioecologia e importância epidemiológica.

RESULTADOS

Durante este estudo foram recebidos no laboratório de entomologia, 59 espécimes de triatomíneos, procedentes de seis municípios: Apuí, Coari, Iranduba, Manaus, Presidente Figueiredo e Uarini (Figura 1), 23/59 (39%) estavam vivos. Maior registro ocorreu nas residências de áreas urbanas 41/59 (47,22%); 45/59 (76,27%) foram encontrados no intradomicílio. Foram identificadas as espécies: *Rhodnius robustus* 27/59 (45,53%), *Panstrongylus geniculatus* 18/59 (30,51%), *Rhodnius pictipes* 13/59 (22,03%) e *Eratyrus mucronatus* 1/59 (1,69%) (Tabela 1).

Em Manaus, registrou-se triatomíneos em todas as zonas urbanas da cidade exceto na zona Centro-Sul, em residências, estão localizadas próximas à fragmentos florestais (Figura 2).

A investigação de infecção natural por *T. cruzi* foi realizada em todos exemplares de triatomíneos recebidos no laboratório. O exame à fresco foi realizado nos 23 triatomíneos recebidos vivos; 10/23 (43,4%) estavam positivos para formas flagelares.

Usando a técnica de PCR multiplex se observou positividade por *T. cruzi* em 36/59 (61%) triatomíneos, dentre as quais 25/36 (42,37%) foram

caracterizadas como linhagem TcI, 10/36 (16,95%) Z3 e 1/36 (1,69%) como TcII. Em três exemplares de *Rh. robustus* registrou-se infecção por *T. rangeli*, e em um exemplar dessa espécie encontrou-se infecção mista por *T. cruzi* e *T. rangeli*.

Na avaliação pela técnica Coll, 33/59 (55,9%) amostras amplificaram fragmentos de aproximadamente 420pb e na avaliação do gene GPI, 30/59 (50,85%) amostras amplificaram fragmentos de 800pb caracterizando positividade para *T. cruzi* respectivamente. Entre as espécies de triatomíneos por ambiente de coleta, observou-se maior taxa de infecção 30/59 (50,84%) em triatomíneos coletados no Intradomicílio (Tabela 1).

Sequenciamento e caracterização genética do *T. cruzi* em Unidades Discretas de Tipagem – DTUs - Das 36 amostras positivas para *T. cruzi* (técnica de multiplex), 17 (47,2%) foram sequenciadas, 3 amostras pela técnica Coll e 14 pela técnica GPI. Na análise do fenograma (Figura 3), em Coll, duas amostras alinharam com a linhagem TcI e uma amostra com TcIII. No GPI, observou-se que sete (50%) alinharam com TcI, cinco (35,71%) com TcIII, uma com TcII e TcIV respectivamente (Figura 3). *R. robustus* apresentou 36,11% (13/36) *R. pictipes* 18,64% (11/36) e *P. geniculatus* 20,33% (12/36). Não foi observada diferença estatística nas taxas de infecção entre as espécies (p valor = 0,081). Das 17 amostras sequenciadas, 8 foram de *P. geniculatus*, sendo detectadas as linhagens TcI, TcII, TcIII e TcIV, quatro foram *R. robustus* identificadas as linhagens TcI, TcIII e TcIV e cinco *R. pictipes* identificada a linhagem TcI (Tabela 1).

Percepção da população sobre DC - Foram realizadas visitas aos moradores que entregaram triatomíneos no laboratório de entomologia, e aplicados 221 questionários entre seus familiares e vizinhos. A maioria 62% pertencem ao sexo masculino, a faixa etária predominante de 41 a 60 anos (45,83%); 107 (48,42%) tinham o ensino médio completo; 184 (83,25%) tem suas residências em uma distância de até 50 metros de fragmentos florestais (Tabela 2).

A maioria 92% relataram já ter ouvido falar da doença de Chagas, mas observou-se diferença significativa ($p = 0,001$) quando se perguntou como a doença pode ser transmitida e 139 (62,90%) não souberam responder (Tabela 3). Do total 34/221 (15,38%) confirmaram ter encontrado barbeiros no interior de suas residências; 102/221 (46,15%) tem entre seus hábitos alimentares consumir carne de animais silvestres, 190/221 (85,97%) consomem suco de frutos de palmeira, 182/190 (96%) consomem açaí e destes 153/182 (84%) disseram que não sabem a procedência do suco comprado e consumido.

Após o período de aplicação dos questionários, cinco moradores encontraram em suas residências 15 triatomíneos. Desse material, 9/15 (60%) estavam infectados com *T. cruzi*. Todas as pessoas disseram ter utilizado o folder educativo, recebido durante a entrevista para comparar o material encontrado.

DISCUSSÃO

A invasão de triatomíneos silvestres em domicílios representa um fenômeno que necessita vigilância, principalmente em locais em que o registro é frequente (29–

33). Os triatomíneos desse estudo foram coletados por moradores dentro de seus domicílios, apresentando altas taxas de infecção e natural por *T. cruzi*, evidenciando a necessidade de educação em saúde, principalmente pelo fato de ter ocorrido numa região onde a população desconhece a participação desses insetos, no ciclo biológico de *T. cruzi*, bem como sua participação na dinâmica de transmissão aos hospedeiros vertebrados, reiterando que a população deve ser orientada para os cuidados preventivos necessários, diante das exposição humana cada vez mais frequente a esses insetos.

Dos 23 triatomíneos recebidos vivos, somente em 10 foram observadas formas flageladas em exame à fresco e lamentavelmente todas as culturas em meio semisólido NNN (Novy-MacNeil-Nicolle) fungaram. Dessa foram a identificação do *T. cruzi* foi realizada através de técnicas biomoleculares, observando-se alta taxa de infecção natural por *T. cruzi* - 61% dos triatomíneos coletados. Desses, 83,33% foram coletados no intradomicílio, evidenciando que esses insetos tem invadido as moradias e a população que reside próximo ao ciclo silvestre do *T. cruzi* está exposta constantemente.

Triatomíneos infectados com *T. cruzi* já foram observados em residências de áreas rurais de Manaus (Magalhães 2009, dados em fase de submissão), (32,34,35), mas nessa região, não foram apresentados dados sobre a invasão de domicílios na área urbana. Entre os possíveis fatores que devem estar favorecendo essa dispersão, está a proximidade das residências com fragmentos de florestas. Grande parte dos triatomíneos deste estudo foi coletada em condomínios recém construídos, cujos espaços tem obrigatoriedade de

manutenção de área verde. As alterações no ambiente provocam mudanças nos ecossistemas e afugentam as fontes alimentares desses insetos, obrigando-os a saírem de suas colônias (atraídos por luz artificial), se arriscando em busca de alimento. Esse comportamento aliado às taxas de infecções elevadas, conforme observado nos dados aqui apresentados e já descritas em outros estudos (16,32–40), pode representar um risco à população para o contato com o *T. cruzi*. Embora nessa região as espécies de triatomíneos ainda não colonizem domicílios (17,30,41), colônias de *P. geniculatus* foi encontrada em ecotopos peridomesticos na Venezuela, Colombia e no Brasil na Ilha de Marajó com porcos domésticos (42,43). Quanto a *R. robustus* (espécie mais frequente no intradomicílio), e *Rh. pictipes* ainda não há relatos de colonização seja no intra ou peridomicílio (32,34,35).

No que diz respeito a caracterização das linhagens de *T. cruzi*, com exceção de TcII (linhagem relacionada ao ciclo doméstico e associada as manifestações clínicas mais graves da doença de Chagas), as demais já foram descritas para o ciclo enzootico do *T. cruzi* na região Amazônica (21,25,27,44,45) sendo *T. cruzi* TcI e TcIV, as DTUs as mais frequentemente registradas no Amazonas, tanto em humanos (nos casos da doença aguda TcI, TcIII, TcIV e doença crônica TcI), quanto em reservatórios (marsupiais) e triatomíneos TcI respectivamente (Monteiro et al, 2011; Santana et al., 2013, 2019). Lima et al., (46) já haviam registrado a ocorrência de TcII no bioma amazônico no Estado do Pará infectando *R. pictipes*. No entanto, esse é o primeiro registro da ocorrência *T. cruzi* TcII no estado do Amazonas, TcIII e TcIV em triatomíneos em Manaus. Jansen et al., (47) ressaltam a importância do registro de *T. cruzi* Tc II no bioma

amazônico, uma vez é a linhagem relacionada ao ciclo doméstico e associada as manifestações clínicas mais graves da doença de Chagas principalmente nas formas digestivas (44).

P. geniculatus, foi detectada com as 4 linhagens de *T. cruzi*, dado que evidencia a ocorrência de um ciclo diverso entre diferentes espécies de reservatórios e hospedeiros silvestres na região (47), e demonstra o ecletismo dessa espécie na busca de fonte alimentar e consequentemente maior susceptibilidade à infecção por diferentes linhagens do parasito. Estudos realizados na Bolívia, Colômbia e Venezuela, também registraram infecção de *P. geniculatus* com diferentes linhagens de *T. cruzi*, Tc I e TcIII, TcI a TcIV, e TcI e TcIII respectivamente (31,48–50).

Na Amazônia atualmente a forma de transmissão de maior notificação de casos é a oral, contudo, a vetorial também deve estar ocorrendo, pelo constante número de casos isolados (21). Nessa região grande parte da população vive próxima ao ciclo silvestre e se expõe ao contato com o vetor diariamente. Considerando que as informações sobre a doença de Chagas, ocorrem apenas quando mídias reportam os surtos da doença relacionados a ingestão de alimentos contaminados, particularmente do açaí, e que essa foi uma informação recebida quando se aplicou o questionário para avaliar o conhecimento da população sobre a doença de Chagas e seus vetores, é de grande relevância a orientação das pessoas, sobre a possibilidade de contato com insetos infectados com *T. cruzi*, particularmente as que registram triatomíneos nos seus domicílios.

Um aspecto interessante evidenciado nas entrevistas foi que mesmo tendo ouvido falar sobre a doença, a grande maioria da população não saberia indicar

nenhuma forma de transmissão e principalmente tinha conhecimento de sua exposição. Dos 15,38% entrevistados que encontraram triatomíneos em sua residência, 53,39% não reconheceriam o inseto caso este aparecesse em sua casa. Isso reforça a hipótese que a frequência de invasão de triatomíneos em Manaus pode ser maior do que a observada neste estudo. Esses relatos reforçam o entendimento de que a população pode não possui conhecimento suficiente para evitar a exposição as formas de transmissão da doença de Chagas e reafirma a necessidade de intensificação das ações sobre educação em saúde.

Considerações Finais

A vigilância entomológica participativa comunitária tem grande relevância como ferramenta no combate da doença de Chagas. As chances de um agente de endemias encontrar um triatomíneo por busca ativa em uma residência em uma região em que não há domiciliação é menor do que a do próprio morador. Com isso, incentivar e orientar a população quanto a presença destes insetos poderia potencializar ainda mais os programa de controle da doença de Chagas, sobretudo na Amazônia (51).

Neste trabalho observou-se que houve aprendizado das informações repassadas pelo retorno de moradores com triatomíneos após o período da aplicação do questionário. Todos afirmaram ter identificado o inseto através do material educativo fornecido pelos entrevistadores. Nesse contexto demonstra-se que vigilância participativa comunitária traz resultados positivos em relação a possibilidade de prevenção da doença de Chagas, quando a população é

orientadas e aprende a identificar os triatomíneos sabendo que se estiverem infectados podem ser vetores da doença (52–55). Além disso, é preciso orientar a população quanto a higienização dos alimentos contaminados, uma vez que, nesse caso, esta é uma fonte de transmissão de difícil fiscalização, mas é a que manifesta maior número de casos da doença nessa região. Já foi comprovada a presença de *T. cruzi* viável em amostras de açaí (56), mas não se sabe de fato, sobre como ocorreu essa contaminação, reiterando a necessidade de orientação à população. O registro da ocorrência de triatomíneos no interior de residências detectados com altas taxas de infecção por *T. cruzi*, representa um risco para a população que pode entrar em contato com o parasito sem ter ideia de sua exposição.

REFERÊNCIAS

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. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro. 1909;1(2):159–218.
2. Carlos Pinto Dias J, Novaes Ramos A, Dias Gontijo E, Luquetti A, Aparecida Shikanai-Yasuda M, Rodrigues Coura J, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol e Serviços Saúde [Internet]. 2016;25(21):1–10. Available from: http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000500007&scielo=S2237-96222016000500007
3. Galvão, Cleber. Gurgel-Gonçalves R. Vetores Conhecidos no Brasil. In: Vetores da doença de Chagas no Brasil. 2014. p. 289.
4. Zingales, B. Andrade, S. G. DA Campbell, E Chiari, O Fernandes, F Guhl, E Lages-Silva, AM Macedo, CR Machado, MA Miles, AJ Romanha, NR Sturm, M Tibayrenc AS. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(7):1051–4.
5. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, 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. Parasitology. 2009;136(6):641–55.
6. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol. 2006;22(12):583–8.

7. Dias J, Silveira A, Schofield C. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro*. 2002;97(5):603–12.
8. Carcavallo R. S I. CDC I. AS I. Gal-G 1. JCG, NOIREAU. CAM-S& F. Geographical distribution and altitudinal dispersion. *Distribuição geográfica e dispersão altitudinal*. In: *Atlas of Chagas' disease vectors in the America* *Atlas dos vetores da doença de Chagas na Américas*. 1999. p. 747–92.
9. Galvão C. *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. 2014. 289 p.
10. Ceccarelli S, Balsalobre A, Medone P, Cano ME, Gonçalves RG, Feliciangeli D, et al. Data Descriptor: DataTri, a database of American triatomine species occurrence. *Sci Data*. 2018;5:1–9.
11. Carcavallo, R., Giron, I., Juberg, J., Lent H. *Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas*. 1997. 393 p.
12. Costa J, Lorenzo M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines--Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009;104 Suppl(Ibge 2008):46–51. Available from: <http://www.bioline.org.br/abstract?id=oc09090%5Cnpapers2://publication/uuid/C1F36381-449D-4394-9147-9853324B1881>
13. Minuzzi-Souza TTC, Nitz N, Cuba CAC, Hagström L, Hecht MM, Santana C, et al. Surveillance of vector-borne pathogens under imperfect detection: Lessons from Chagas disease risk (mis)measurement. *Sci Rep*. 2018;8(1):2–11.
14. Abad-Franch F, Lima MM, Sarquis O, Gurgel-Gonçalves R, Sánchez-Martín M, Calzada J, et al. On palms, bugs, and Chagas disease in the

- Americas. *Acta Trop*. 2015;151(1):126–41.
15. Péneau J, Nguyen A, Flores-Ferrer A, Blanchet D, Gourbière S. Amazonian Triatomine Biodiversity and the Transmission of Chagas Disease in French Guiana: In Medio Stat Sanitas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):1–23.
 16. Massaro DC, Rezende DS, Camargo LMA. Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil. *Rev Bras Epidemiol*. 2008;11(2):228–40.
 17. Jácome-Pinilla D, Hincapié-Peñaloza E, Ortiz MI, Ramírez JD, Guhl F, Molina J. Risks associated with dispersive nocturnal flights of sylvatic Triatominae to artificial lights in a model house in the northeastern plains of Colombia. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2015;8(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1209-3>
 18. Carrasco J, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Martí CE, Garcia C, et al. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. 2012;6(6).
 19. Magalhães BML, Coelho LIARC, 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. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2011;44(6):697–702. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231243>
 20. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE Cidades. 2019. p. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/panorama>.
 21. Vale G, Marcos J, Ferreira B, Ruth A, Arcanjo L, Amélia R, et al. Review Article Chagas disease in the State of Amazonas : history , epidemiological evolution , risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med*

- Trop. 2015;48(1):27–33.
22. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the triatominae (hemiptera, deduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. Bull Am Museum Nat Hist. 1979;163:123–520.
 23. Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira ACV, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95(1):97–9.
 24. 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):0226–35.
 25. Gonçalves RA, Magalhães LK, Magalhães LK, Prestes SR, Maciel MG, da Silva GA, et al. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. Parasit Vectors [Internet]. 2014;7(1):267. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24916362>
 26. Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR. SlipJtDetail.pdf. 2003;421(February).
 27. 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 [Internet]. 2012;7(7):e41284. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3405119&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

28. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Catálogo de imagens. 2019. p.
<http://www.inpe.br/>.
29. Brito RN, Gorla DE, Diotaiuti L, Gomes ACF, Souza RCM, Abad-Franch F. Drivers of house invasion by sylvatic Chagas disease vectors in the Amazon-Cerrado transition: A multi-year, state-wide assessment of municipality-aggregated surveillance data. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(11):1–25.
30. Cavallo MJ, Amelotti I, Gorla DE. Invasion of rural houses by wild Triatominae in the arid Chaco. *J Vector Ecol*. 2016;41(1):97–102.
31. Rojas-Cortez M, Pinazo MJ, Garcia L, Arteaga M, Uriona L, Gamboa S, et al. Trypanosoma cruzi-infected *Panstrongylus geniculatus* and *Rhodnius robustus* adults invade households in the Tropics of Cochabamba region of Bolivia. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1445-1>
32. Batista DG, Britto C, Monte GLS, Baccaro FB. Occurrence of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in domestic and natural environments in Novo Remanso, Itacoatiara, Amazonas, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52(June):11–4.
33. Ribeiro G, Gurgel-Gonçalves R, Reis RB, Santos CGS dos, Amorim A, Andrade SG, et al. Frequent House Invasion of Trypanosoma cruzi-Infected Triatomines in a Suburban Area of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4):1–10.
34. Fé NF, Magalhães LK, Fé FA, Arakian SK, Monteiro WM, Barbosa V. Ocorrência de triatomíneos em ambientes silvestres e domiciliares do município de Manaus , Estado do Amazonas Occurrences of triatomines in

- wild and domestic environments in the municipality of Manaus , State of Amazonas. 2009;42(6):642–6.
35. Naiff M de F, Naiff RD, Barrett T V. Chagas' disease wild vectors in the urban area of Manaus, State of Amazonas, Brazil: flight activities in dry and rainy seasons. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31(1):103–5.
 36. Barbosa-silva AN, Cláudia A, Martins K, Nunes DF, Igor P, Oliveira C De, et al. Major Article Characteristics of Triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the State of Rio Grande do Norte , Brazil. 2016;49(January):57–67.
 37. Preto DO, Rondônia E De, Meneguetti DUDO, Trevisan O, Marcelo L, Camargo A, et al. Communication / Comunicação Natural infection of triatomines (Hemiptera : Reduviidae) by trypanosomatids in two different environments in the municipality of Ouro Preto do Oeste , State of Rondônia , Brazil. 2012;45(3):395–8.
 38. Teixeira ARL, Monteiro PS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauriapires L, et al. Emerging Chagas Disease : Trophic Network and Cycle of Transmission of *Trypanosoma cruzi* from Palm Trees in the Amazon. 2001;7(1):100–12.
 39. Brasileira S, Tropical DM, Almeida PS De, Júnior WC, Obara MT. Levantamento da fauna de Triatominae (Hemiptera : Reduviidae) em ambiente domiciliar e infecção natural por Trypanosomatidae no Estado de Mato Grosso do Sul Survey of Triatominae (Hemiptera : Reduviidae) fauna in domestic environments and natural infe. 2008;2008:374–80.
 40. Albarelli A. Distribuição e infecção de triatomíneos por *trypanosoma* do tipo *cruzi* na ilha de são luís-maranhão. 1985;18(4):257–9.

41. Pacheco-Tucuch FS, Ramirez-Sierra MJ, Gourbière S, Dumonteil E. Public street lights increase house infestation by the chagas disease vector *triatoma dimidiata*. PLoS One. 2012;7(4):3–9.
42. Valente V da C. Potencial de domiciliação de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) no município de Muaná, Ilha de Marajó, nordeste do Estado do Pará, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(5):595–7.
43. Wolff M CD. Evidencias de domesticación y aspectos biológicos de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera: Reduviidae). Acta Entomol Chil. 2000;24:77–83.
44. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol [Internet]. 2012;12(2):240–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
45. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell D a., 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.
46. Lima VD o. S, Xavier SC ristin. das C, Maldonado IF abíol. R, Roque ALR odrigue., Vicente AC arolin. P, Jansen AM ari. Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI genotypes in the Brazilian Amazon. PLoS One. 2014;9(12):e116137.
47. Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the

- sylvatic environment. *Acta Trop* [Internet]. 2015;151(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.018>
48. Carrasco HJ, Segovia M, Londoño JC, Ortegoza J, Rodríguez M, Martínez CE. *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: High risk factors for Chagas' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1).
 49. Hernández C, Salazar C, Brochero H, Teherán A, Buitrago LS, Vera M, et al. Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia : parasite infection , feeding sources and discrete typing units. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016;1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1907-5>
 50. Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Martínez C, et al. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in venezuela. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6).
 51. OPAS. Guia para vigilância , prevenção,controle e manejo clínico da doença e chagas aguda transmitida por alimentos. Guia para vigilância , prevenção,controle e manejo clínico da doença e chagas aguda Transm por Aliment. 2009;92.
 52. Santos WS, De AR. Community Participation in Chagas Disease Vector Surveillance : Systematic Review. 2011;5(6).
 53. Dias JVL, Queiroz DRM, Diotaiuti L, Pires HHR. Conhecimentos sobre triatomíneos e sobre a doença de Chagas em localidades com diferentes níveis de infestação vetorial. *Cienc e Saude Coletiva*. 2016;21(7):2293–304.

54. Silveira AC, De Rezende DF, Nogales AM, Cortez-Escalante JJ, Castro C, Macêdo V. Avaliação do sistema de vigilância entomológica da doença de Chagas com participação comunitária em Mambai e Buritinópolis, Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(1):39–46.
55. Villela MM, Pimenta DN, Lamounier PA, Dias JCP. Avaliação de conhecimentos e práticas que adultos e crianças têm acerca da doença de chagas e seus vetores em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2009;25(8):1701–10.
56. Santana RAG, Guerra MGVB, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz J V., Oliveira M, et al. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(1):132–5.

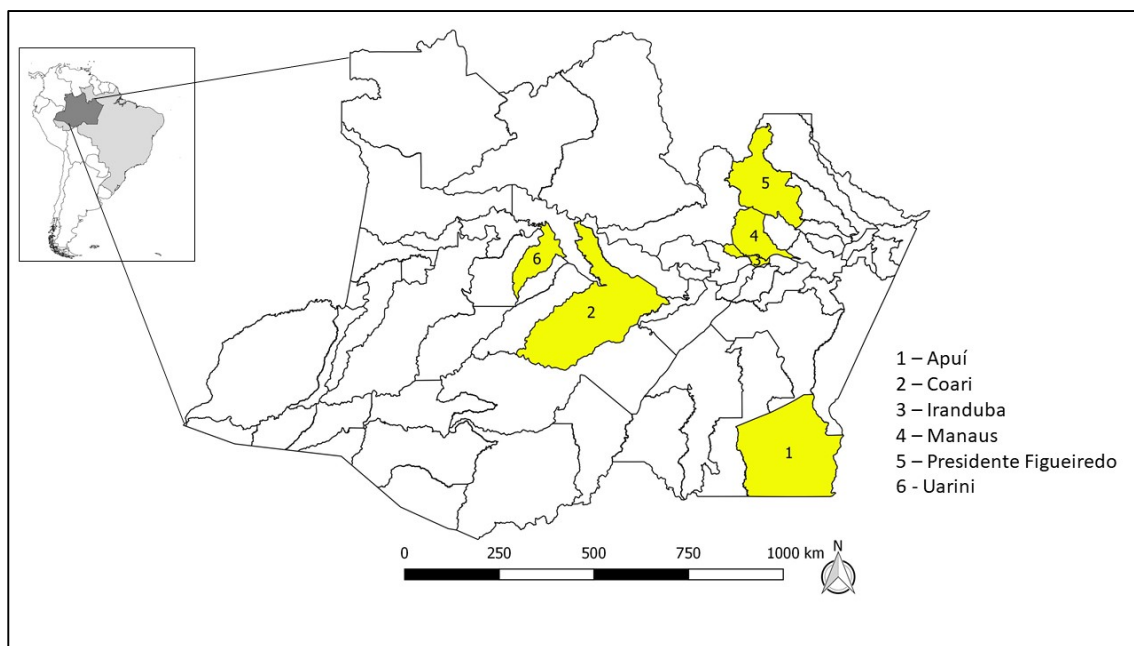


Figura 1: Mapa do Estado do Amazonas com destaque em amarelo para os municípios com registros dos triatomíneos incluídos no estudo

Tabela 1: Nome das espécies de triatomíneos coletados e recebidos na Gento/FMTHVD, por local de registro, taxa de infecção e linhagem de *T. cruzi* detectada. %inf= percentual de infecção; %/esp= percentual por espécie

Espécie	Total	%Inf.	Intra	Peri	Extra	%/esp.	Linhagem
<i>Eratyrus mucronatus</i>	0/1	0	0/0	0/0	0/0	0	-
<i>Panstrongylus geniculatus</i>	12/18	33,3	12/16	0/2	0/0	66,66	Tcl, TcII, TcIII, TcIV
<i>Rhodnius pictipes</i>	11/13	30,5	10/12	1/1	0/0	84,61	Tcl
<i>Rhodnius robustus</i>	9/27	36,1	8/17	1/3	4/7	33,33	Tcl, TcIII, TcIV
Total	36/59	61	30/45	2/7	4/7	-	

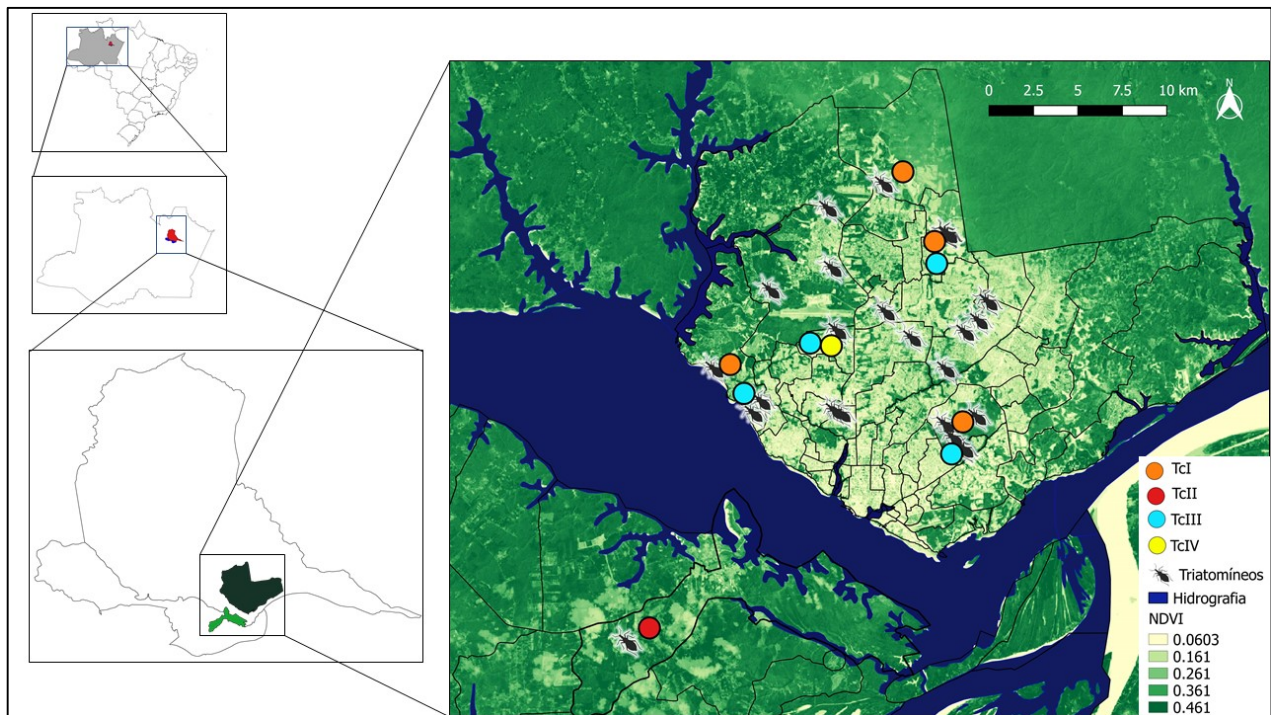


Figura 2: Imagem Landsat de Manaus e Iranduba, com destaque para os pontos de coleta dos triatomíneos e respectivas linhagens de *T. cruzi*.

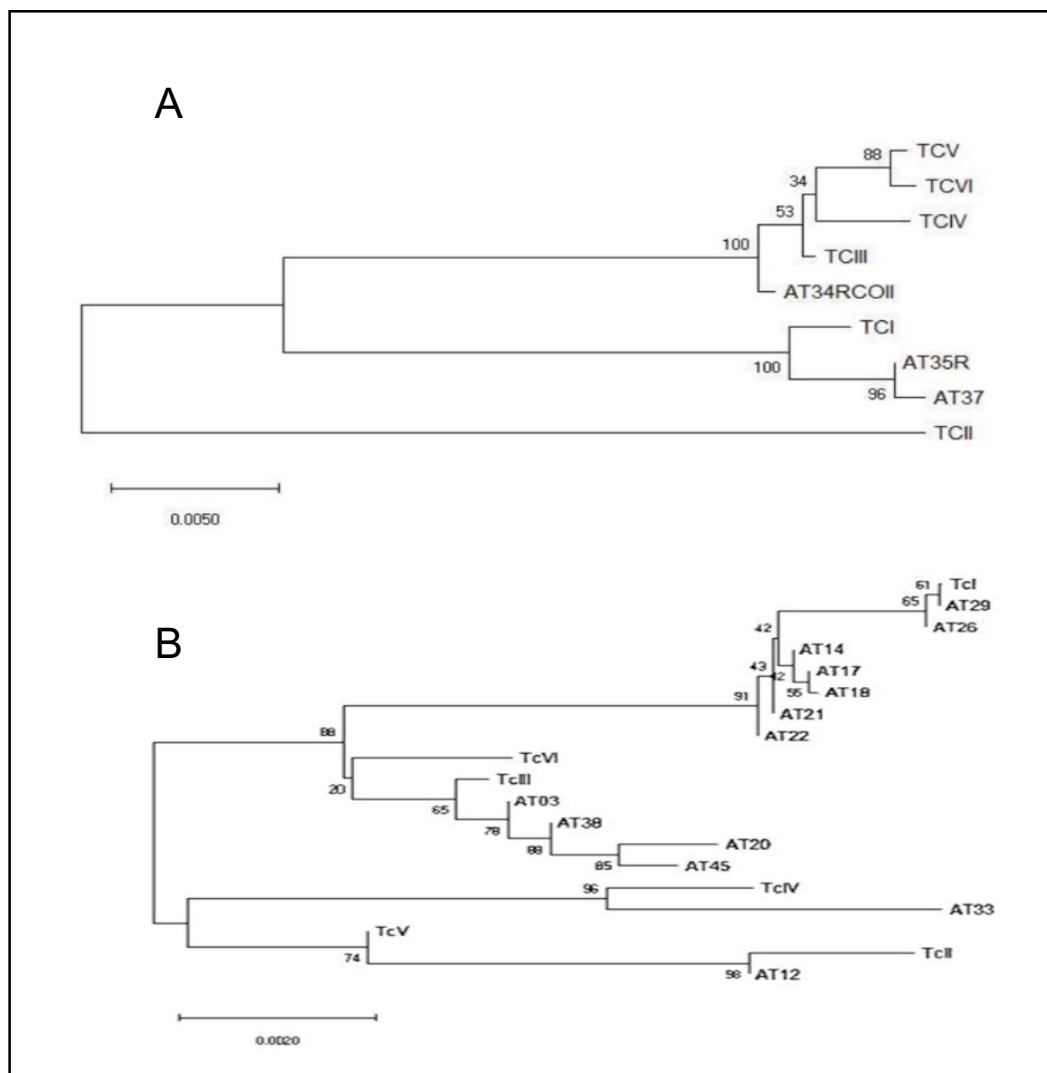


Figura 3: Análise do fenograma dos isolados de *T. cruzi*. A: Árvore criada a partir da análise das sequências do gene da Citocromo oxidase, em que as amostras alinharam para as linhagens TcI e TcIII/TcIV. B: Árvore criada a partir da análise das sequências do gene Glicose-fosfato-isomerase (GPI), agrupando 7 amostras com a linhagem TcI; quatro amostras com TcIII; uma amostra com TcIV e por fim, a amostra AT12 alinhou para a cepa de referência TcII.

Tabela 2: Perfil epidemiológico dos entrevistados

Entrevistados= 221			
Categoria	Subcategoria	N	X
Gênero	Feminino	138	62,44
	Masculino	83	37,56
Faixa etária	0-20	6	2,71
	21-40	78	35,29
	41-60	100	45,83
	>60	37	16,74
Escolaridade	Alfabetizada	3	1,46
	1º a 4º ano	11	4,98
	5º a 9º	22	9,95
	Ens. Médio	107	48,42
	Superior	72	32,58
	N.I.	6	2,71
Zona urbana	Centro-oeste	27	12,22
	Leste	70	31,67
	Norte	118	53,39
	Sul	6	2,71
Prox. com mata	até 10m	91	41,18
	de 11 a 50m	93	42,08
	de 51 a 80m	37	16,74

Tabela 3: Descrição da percepção da população sobre Triatomíneos e a doença de Chagas

Categoria	Entrevistados		
	N	%	P valor
Já ouviu falar da Doença de Chagas?	221		0,000
SIM	205	92,73	
NÃO	16	7,24	
Sabe como a doença é transmitida?	221		0,000
SIM	82	37,1	
NÃO	139	62,9	
Ouviu falar do barbeiro?	221		0,000
SIM	190	85,97	
NÃO	31	14,03	
Reconheceria um barbeiro?	221		0,000
SIM	103	46,61	
NÃO	118	53,39	
Consome carne de caça?	221		0,000
SIM	102	46,15	
NÃO	119	53,85	
Consome suco de frutos de palmeiras?	221		0,000
SIM	190	85,97	
NÃO	31	14,03	
Conhece a procedência do suco	221		0,000
SIM	36	18,95	
NÃO	154	81,05	

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Dentre as limitações estão:

Dificuldade na análise dos genes para caracterização do *T. cruzi* devido a problemas no equipamento de sequenciamento das amostras.

Em perspectiva, os trabalhos de investigação da taxa de infecção natural de novos triatomíneos continuarão para expansão do conhecimento sobre a dinâmica de transmissão da DC no estado do Amazonas.

Implementação da investigação das atitudes práticas da população sobre DC em municípios da região metropolitana de Manaus

5. CONCLUSÃO

5.1 Registrou-se uma frequência de 59 triatomíneos coletados por moradores, no intra e peridomicílio;

5.2 Estimou-se alta taxa de infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos 61% sendo 66% intra e 28,5% peri domicílio;

5.3 Foram identificadas 4 linhagens de *T. cruzi* (TcI, TcII, TcIII e TcIV) das quais TcII é registrada pela primeira vez em *P. geniculatus*, espécie com maior diversidade de linhagens, encontrada com infecção por *T. cruzi* TcI, TcII, TcIII e TcIV.

5.4 Quanto a percepção da população sobre Triatomíneos e a doença de Chagas, a maioria dos entrevistados tem suas casas construídas próximo de florestas, já tinham ouvido falar da doença de Chagas, mas não conheciam nenhuma das formas de transmissão do *T. cruzi* para o homem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. 4th WHO NTDs report_April2017. 2017.
2. Carlos Pinto Dias J, Novaes Ramos A, Dias Gontijo E, Luquetti A, Aparecida Shikanai-Yasuda M, Rodrigues Coura J, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol e Serviços Saúde [Internet]. 2016;25(21):1–10. Available from: http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000500007&scielo=S2237-96222016000500007
3. Galvão, Cleber. Gurgel-Gonçalves R. Vetores Conhecidos no Brasil. In: Vetores da doença de Chagas no Brasil. 2014. p. 289.
4. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell D a., 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.
5. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, 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. Parasitology. 2009;136(6):641–55.
6. Carcavallo, R., Giron, I., Juberg, J., Lent, H. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. 1997. 393 p.
7. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the triatominae (hemiptera, deduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. Bull Am Museum Nat Hist. 1979;163:123–520.
8. 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. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro. 1909;1(2):159–218.
9. Silveira AC, Martins E, Ao Sumário V. SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros 2. Histórico do controle da transmissão vetorial e situação epidemiológica atual. 2014;
10. Miles M a, Feliciangeli MD, Arias AR de. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. Bmj. 2003;326(fig 1):1444–8.

11. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2001;1(2):92–100. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309901000652>
12. Galvão C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. 2014. 289 p.
13. Cailleaux SRP, Cunha V, Verly S, Junior VDL, Jurberg J. Resistência ao jejum de *Rhodnius stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) em condições de laboratório. *Rev Pan-Amazônica Saúde* [Internet]. 2011;2(2):39–43. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232011000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=en
14. Gurgel-gonc R, Costa J, Peterson AT. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. 2012;2012.
15. Brasil. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. Ministério da Saúde Bol epidemiológico [Internet]. 2019;50:10. Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/23/2018-025.pdf>
16. Lehane MJ, Schofield CJ. Field experiments of dispersive flight by *triatoma infestans*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75(3):399–400.
17. Lazzari CR icardo. Biologia e comportamento. In: Vetores da doença de Chagas no Brasil. 2014. p. 64–74.
18. Abad-Franch F, Santos WS, Schofield CJ. Research needs for Chagas disease prevention. *Acta Trop* [Internet]. 2010;115(1–2):44–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.002>
19. Forattini OP, Ferreira OA, Rocha e Silva EO da, Rabello EX. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana: V- observações sobre colonização espontânea de triatomíneos silvestres em ecótopos artificiais, com especial referência ao *Triatoma sordida*. *Rev Saude Publica* [Internet]. 1973;7(3):219–39. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101973000300004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
20. Forattini OP, Ferreira OA, da Rocha e Silva EO, Rabello EX. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XV--Desenvolvimento, variação e permanência de *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e

- Rhodnius neglectus* em ecótopos artificiais. Rev Saude Publica. 1979;13(3):220–34.
21. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol. 2006;22(12):583–8.
 22. Forattini OP. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliary in Brazil. Revista de Saúde Pública, 14(3):265-99, 1980. Rev Saude Publica. 2006;40(6):964–98.
 23. Abad-Franch F, Palomeque FS, Aguilar VHM, Miles MA. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): Risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. Trop Med Int Heal. 2005;10(12):1258–66.
 24. Coura JR, Junqueira ACV, Boia MN, Fernandes O, Bonfante C, Campos JE, et al. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]. 2002;44(3):159–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163910>
 25. Dias J, Silveira A, Schofield C. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro. 2002;97(5):603–12.
 26. Valente V da C. Potencial de domiciliação de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) no município de Muana, Ilha de Marajó, nordeste do Estado do Pará, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(5):595–7.
 27. Ricardo-Silva A, Gonçalves TCM, Luitgards-Moura JF, Lopes CM, da Silva SP, Bastos AQ, et al. *Triatoma maculata* colonises urban domiciles in Boa Vista, Roraima, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(11):703–6.
 28. Teixeira ARL, Monteiro PS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauriapires L, et al. Emerging Chagas Disease : Trophic Network and Cycle of Transmission of *Trypanosoma cruzi* from Palm Trees in the Amazon. 2001;7(1):100–12.
 29. Ricardo-silva AH, Lopes CM, Ramos LB, Marques WA, Mello CB, Duarte R, et al. Acta Tropica Correlation between populations of *Rhodnius* and presence of palm trees as risk factors for the emergence of Chagas disease in Amazon region , Brazil. 2012;123:217–23.
 30. Abad-Franch F, Lima MM, Sarquis O, Gurgel-Gonçalves R, Sánchez-

- Martín M, Calzada J, et al. On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. *Acta Trop*. 2015;151(1):126–41.
31. Fé NF, Magalhães LK, Fé FA, Arakian SK, Monteiro WM, Barbosa V. Ocorrência de triatomíneos em ambientes silvestres e domiciliares do município de Manaus , Estado do Amazonas Occurrences of triatomines in wild and domestic environments in the municipality of Manaus , State of Amazonas. 2009;42(6):642–6.
 32. Vale G, Marcos J, Ferreira B, Ruth A, Arcanjo L, Amélia R, et al. Review Article Chagas disease in the State of Amazonas : history , epidemiological evolution , risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(1):27–33.
 33. Magalhães BML, Coelho LIARC, Maciel MG, Ferreira JMBB, 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. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2011;44(6):697–702. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231243>
 34. Gonçalves RA, Magalhães LK, Magalhães LK, Prestes SR, Maciel MG, da Silva GA, et al. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014;7(1):267. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24916362>
 35. 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* [Internet]. 2012;7(7):e41284. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3405119&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 36. Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saude Publica*. 1969;3(2):153–7.
 37. Dias JCP, Amato Neto V. [Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2011;44 Suppl 2:68–72. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-

- 86822011000800011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21584360
38. Zingales, B. Andrade, S. G. DA Campbell, E Chiari, O Fernandes, F Guhl, E Lages-Silva, AM Macedo, CR Machado, MA Miles, AJ Romanha, NR Sturm, M Tibayrenc AS. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(7):1051–4.
 39. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol [Internet]. 2012;12(2):240–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
 40. Ceccarelli S, Balsalobre A, Medone P, Cano ME, Gonçalves RG, Feliciangeli D, et al. Data Descriptor: DataTri, a database of American triatomine species occurrence. Sci Data. 2018;5:1–9.
 41. Costa J, Lorenzo M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines--Chagas disease vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2009;104 Suppl(Ibge 2008):46–51. Available from: <http://www.bioline.org.br/abstract?id=oc09090%5Cnpapers2://publication/uuid/C1F36381-449D-4394-9147-9853324B1881>
 42. Minuzzi-Souza TTC, Nitz N, Cuba CAC, Hagström L, Hecht MM, Santana C, et al. Surveillance of vector-borne pathogens under imperfect detection: Lessons from Chagas disease risk (mis)measurement. Sci Rep. 2018;8(1):2–11.
 43. Péneau J, Nguyen A, Flores-Ferrer A, Blanchet D, Gourbière S. Amazonian Triatomine Biodiversity and the Transmission of Chagas Disease in French Guiana: In Medio Stat Sanitas. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):1–23.
 44. Massaro DC, Rezende DS, Camargo LMA. Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil. Rev Bras Epidemiol. 2008;11(2):228–40.
 45. Jácome-Pinilla D, Hincapié-Peñaloza E, Ortiz MI, Ramírez JD, Guhl F, Molina J. Risks associated with dispersive nocturnal flights of sylvatic Triatominae to artificial lights in a model house in the northeastern plains of Colombia. Parasites and Vectors [Internet]. 2015;8(1):1–11. Available

- from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1209-3>
46. Carrasco J, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Martí CE, Garcia C, et al. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. 2012;6(6).
 47. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE Cidades. 2019. p. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/panorama>.
 48. Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira ACV, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95(1):97–9.
 49. 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):0226–35.
 50. Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR. SlipJtDetail.pdf. 2003;421(February).
 51. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Catálogo de imagens. 2019. p. <http://www.inpe.br/>.
 52. Brito RN, Gorla DE, Diotaiuti L, Gomes ACF, Souza RCM, Abad-Franch F. Drivers of house invasion by sylvatic Chagas disease vectors in the Amazon-Cerrado transition: A multi-year, state-wide assessment of municipality-aggregated surveillance data. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(11):1–25.
 53. Cavallo MJ, Amelotti I, Gorla DE. Invasion of rural houses by wild Triatominae in the arid Chaco. J Vector Ecol. 2016;41(1):97–102.
 54. Rojas-Cortez M, Pinazo MJ, Garcia L, Arteaga M, Uriona L, Gamboa S, et al. *Trypanosoma cruzi*-infected *Panstrongylus geniculatus* and *Rhodnius robustus* adults invade households in the Tropics of Cochabamba region of Bolivia. Parasites and Vectors [Internet]. 2016;9(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1445-1>
 55. Batista DG, Britto C, Monte GLS, Baccaro FB. Occurrence of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in domestic and natural environments in Novo Remanso, Itacoatiara, Amazonas, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2019;52(June):11–4.

56. Ribeiro G, Gurgel-Gonçalves R, Reis RB, Santos CGS dos, Amorim A, Andrade SG, et al. Frequent House Invasion of *Trypanosoma cruzi*-Infected Triatomines in a Suburban Area of Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(4):1–10.
57. Naiff M de F, Naiff RD, Barrett T V. Chagas' disease wild vectors in the urban area of Manaus, State of Amazonas, Brazil: flight activities in dry and rainy seasons. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31(1):103–5.
58. Barbosa-silva AN, Cláudia A, Martins K, Nunes DF, Igor P, Oliveira C De, et al. Major Article Characteristics of Triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the State of Rio Grande do Norte , Brazil. 2016;49(January):57–67.
59. Preto DO, Rondônia E De, Meneguetti DUDO, Trevisan O, Marcelo L, Camargo A, et al. Communication / Comunicação Natural infection of triatomines (Hemiptera : Reduviidae) by trypanosomatids in two different environments in the municipality of Ouro Preto do Oeste , State of Rondônia , Brazil. 2012;45(3):395–8.
60. Brasileira S, Tropical DM, Almeida PS De, Júnior WC, Obara MT. Levantamento da fauna de Triatominae (Hemiptera : Reduviidae) em ambiente domiciliar e infecção natural por Trypanosomatidae no Estado de Mato Grosso do Sul Survey of Triatominae (Hemiptera : Reduviidae) fauna in domestic environments and natural infe. 2008;2008:374–80.
61. Albarelli A. Distribuição E Infecção De Triatomíneos Por Trypanosoma Do Tipo Cruzii Na Ilha De São Luís-Maranhão. 1985;18(4):257–9.
62. Pacheco-Tucuch FS, Ramirez-Sierra MJ, Gourbière S, Dumonteil E. Public street lights increase house infestation by the chagas disease vector triatoma dimidiata. PLoS One. 2012;7(4):3–9.
63. Lima VD o. S, Xavier SC ristin. das C, Maldonado IF abíol. R, Roque ALR odrigue., Vicente AC arolin. P, Jansen AM ari. Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI genotypes in the Brazilian Amazon. PLoS One. 2014;9(12):e116137.
64. Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. Acta Trop [Internet]. 2015;151(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.018>

65. Carrasco HJ, Segovia M, Londoño JC, Ortegoza J, Rodríguez M, Martínez CE. *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: High risk factors for Chagas' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1).
66. Hernández C, Salazar C, Brochero H, Teherán A, Buitrago LS, Vera M, et al. Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia : parasite infection , feeding sources and discrete typing units. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016;1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1907-5>
67. Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Martínez C, et al. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in venezuela. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6).
68. OPAS. Guia para vigilância , prevenção, controle e manejo clínico da doença e chagas aguda transmitida por alimentos. Guia para vigilância , prevenção, controle e manejo clínico da doença e chagas aguda Transm por Aliment. 2009;92.
69. Santos WS, De AR. Community Participation in Chagas Disease Vector Surveillance : Systematic Review. 2011;5(6).
70. Dias JVL, Queiroz DRM, Diotaiuti L, Pires HHR. Conhecimentos sobre triatomíneos e sobre a doença de Chagas em localidades com diferentes níveis de infestação vetorial. *Cienc e Saude Coletiva*. 2016;21(7):2293–304.
71. Silveira AC, De Rezende DF, Nogales AM, Cortez-Escalante JJ, Castro C, Macêdo V. Avaliação do sistema de vigilância entomológica da doença de Chagas com participação comunitária em Mambai e Buritinópolis, Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(1):39–46.
72. Villela MM, Pimenta DN, Lamounier PA, Dias JCP. Avaliação de conhecimentos e práticas que adultos e crianças têm acerca da doença de chagas e seus vetores em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2009;25(8):1701–10.
73. Santana RAG, Guerra MGVB, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz J V., Oliveira M, et al. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(1):132–5.

7. ANEXOS

Procedimentos Operacionais Padrão

	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: Detecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> em triatomíneos por compressão abdominal		
Elaborado por: Rubens Celso Andrade da Silva Junior Laylah Kelre Costa Magalães Sílvia Justiniano	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra	Data de aplicação: 25 de abril de 2019 Data da próxima revisão

OBJETIVO

Descrever o procedimento para detecção de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos

DEFINIÇÕES

Não se aplica

APLICÁVEL A:

Pesquisa parasitária em triatomíneos que possam estar infectados por *T. cruzi*

RESPONSABILIDADES

Gerente da Entomologia, técnicos e alunos de mestrado e doutorado

POP'S RELACIONADOS

Cultivo de *T. cruzi* em meio sólido (meio NNN)

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO

Óculos de proteção

Jaleco descartável

Luvas de procedimentos

Mascara descartável

Touca descartável

RECURSOS NECESSÁRIOS

Placa de petri

Pinças

Lâminas

Lamínulas

Soro fisiológico

Seringa de 1ml

Papel toalha

Microtubos 1,5 ml

tesoura

EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS

Lupa estereoscópica

Microscópio

PROCEDIMENTOS

Acondicionar o triatomíneo em placa de petri e levar a lupa;

Com auxílio de pinças, imobilizar o triatomíneo pelo tórax sobre a lâmina;

Com outra pinça fazer leves compressões no abdômen do inseto de cima para baixo, até que as excretas saiam;

Cortar o último segmento do abdômen e com auxílio de pinça retirar o intestino médio de forma lenta.

Macerar o intestino médio na lâmina

Triatomíneos mortos recentemente em que não é possível excretar fezes: inocular soro fisiológico diretamente no abdômen do inseto, em seguida, repetir o item 8.3

Guardar o triatomíneo em microtubo de 1,5 ml devidamente identificado em freezer a -20°C

Utilizar uma gota de soro fisiológico sobre as fezes e espalhar com auxílio da agulha

Por lamínula e levar ao microscópio na objetiva de 40x.

Buscar formas flageladas característica de *trypanosoma* sp. em diferentes campos formando “zig-zag”, cobrindo toda a área lamínula.

Após confirmação para formas flageladas notificar técnico

Para cultivo em meio de cultura lavar lâmina com soro fisiológico em placa de petri estéril.

Utilizar seringa estéril para fazer sucção do material da placa

Transportar até câmara de fluxo laminar – seguir protocolo de inóculo em meio de cultura.

NOTA: A negatividade da lâmina não descarta a possibilidade de infecção. Verificar crescimento em cultura e/ou detecção por técnicas moleculares.

LIMITAÇÕES

Não é possível realizar este procedimento com triatomíneos secos a muito tempo

REFERÊNCIAS

SILVA, I. G. LUQUETTI, A. O. SILVA, H. H. G. importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da susceptibilidade triatomínica para *Trypanosoma cruzi*. rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 26(1):19-24, 1993

	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: EXTRAÇÃO DE DNA POR KIT UTILIZANDO PURELINK KIT® (INVITROGEN)		
Elaborado por: Débora Raysa T. de Sousa	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra Rosa Amélia Gonçalves Henrique Silveira	Data de aplicação 25 de abril de 2019
		Data da próxima revisão 25 de abril de 2020

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.

DEFINIÇÕES

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

CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial complementar.

RESPONSABILIDADES

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

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).

EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Jaleco, luvas, máscara e touca.

RECURSOS NECESSÁRIOS

Amostra

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

Materiais

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

7.2.2. Ponteiras 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%.

Equipamentos

7.3.1. Centrífuga

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

7.3.3. Agitador de tubos (Vortex)

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%.

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 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.

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 a coluna;
- 8.2.20. Armazenar o DNA extraído em freezer a -20°C.

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.*

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 µL do Genomic Difestion Buffer ao macerado;

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

8.4.9. 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.*

PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

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

LIMITAÇÕES

10.1. O material de sangue ou cultura, para ser extraído, é necessário, segundo o fabricante, ter no mínimo 200µL 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.

REFERÊNCIAS

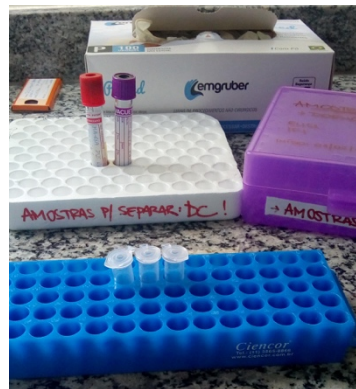
Schaerfer R. Técnicas em Biologia Molecular. Embrapa. 2006.

ANEXOS

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

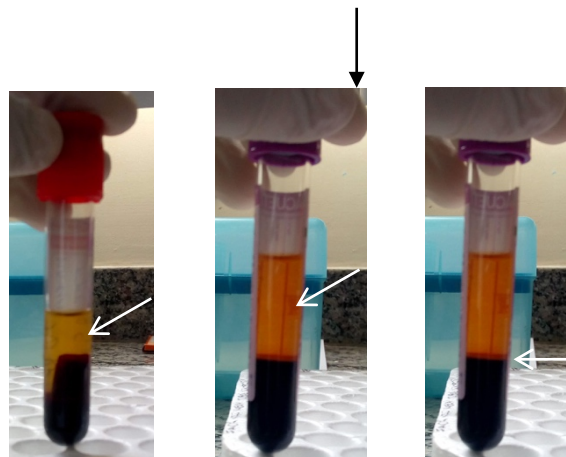
Anexo I

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



Fonte: Ortiz, J. 2019.

Etapa 1: Separar três microtubos e identificar.



	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: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>- Protocolo Multiplex mini exon		
Elaborado por: Débora Raysa T. de Sousa	Revisado e aprovado por:	Data de aplicação 25 de abril de 2019 Data da próxima revisão 25 de abril de 2020

OBJETIVOS:

Descrever o procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase), protocolo mini exon para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e diferenciação de linhagens TcI, TcII, Z3 e *T. rangeli*

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.

APLICÁVEL A

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

RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

POPs RELACIONADOS

POP_ENT_LB_00_v01_PT- Procedimento para extração de DNA por kit utilizando PureLink Kit® (Invitrogen)

POP_ENT_LB_00_v01_PT- Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*- Protocolo COII (subunidade II da citocromo oxidase).

RECURSOS NECESSÁRIOS

DNA extraído: A partir da extração por Kit ou caseira

Materiais:

- 6.2.1 Tubo tipo Eppendorf de 0,2 mL e 1,5 mL
- 6.2.2 Ponteiras descartáveis com filtro em suporte apropriado
- 6.2.3 Pipetas de 2, 10, 100 e 1.000 µL
- 6.2.4 Caixa de descarte de material com hipoclorito de sódio
- 6.2.5 Frasco lavador com álcool 70%
- 6.2.6 Erlenmeyer 100ml
- 6.2.7 Proveta 100ml

6.3 Equipamentos:

- 6.3.1 Termociclador
- 6.3.2 Fonte de eletroforese
- 6.3.3 Agitador de tubos
- 6.3.4 Microondas

6.4 Reagentes, meios e soluções:

- 6.4.1 Frasco com água Ultra Pura
- 6.4.2 Buffer de PCR 10x
- 6.4.3 MgCl₂ 50mM
- 6.4.4 Nucleotídeos dATP + dCTP + dTTP + dGTP 10mM
- 6.4.5 Primer: TcI
- 6.4.6 Primer: TcII
- 6.4.7 Primer: Z3
- 6.4.8 Primer TR

6.4.9 Exon

6.4.10 Enzima Taq Polymerase Platinum 5U

6.4.11 Marcador de peso molecular

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

6.4.12 Solução Tampão para eletroforese

Diluir o TBE 10X para 1X (100ml de TBE 10X para 900ml de água destilada)

6.4.13 Tampão de corrida

6.4.14 Brometo de etídio

PROCEDIMENTOS

7.1 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)

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

Reagentes	Quantidade (µl)
H₂O	31,00
Buffer de PCR 10x	5,00
MgCl₂	3,00
dNTP	3,00
Tcl	0,50
TcII	0,50
Z3	0,50
TR	0,50
Exon	0,50
Taq DNA Polimerase	0,50
Total	45,00

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.

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

7.1.3 Adicionar 5µL do DNA extraído

7.2 Ciclos Térmicos

7.2.1 Introduzir os tubos no termociclador, programado para os seguintes ciclos de temperatura e tempo

95°C	5 min	1X
94°C	30 seg	
55°C	30 seg	35X
72°C	30 seg	
72°C	10 min	1X
4°C	infinito	

7.3 Controles

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

7.4 Eletroforese

7.4.1 Para fazer um gel de 2%

7.4.1.1 Pesar 2g de agarose

7.4.1.2 Medir em uma proveta 100ml de TBE

7.4.1.3 Adicionar em um elenmeyer a agarose e o TBE

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

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

7.4.1.6 Adicionar a mistura na placa e aguardar a polimerização

7.4.2 Colocar a placa com gel na cuba de eletroforese

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

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

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

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

7.4 Revelação

7.4.1 Fazer a leitura do gel no Transiluminador- UV

7.4.2 A visualização de uma única banda de pares de base de ~200pb indicará a presença de DNA de *Trypanosoma cruzi* amplificado (PCR positiva).

LIMITAÇÕES E CUIDADOS A SEREM TOMADOS

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 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.

REFERÊNCIAS

Araújo-Jorge TC, Pirmez C. Normas de segurança para o trabalho com *Trypanosoma cruzi*. In:

Araújo-Jorge TC, Castro SL. Doença de Chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ 2000, p. 125-132.

Bronfen E, de Assis Rocha FS, Machado GB, Perillo MM, Romanha AJ, Chiari E. Isolation of *Trypanosoma cruzi* samples by xenodiagnosis and hemoculture from patients with chronic Chagas' disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84(2): 237-40.

Miles MA, Póvoa MM, Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS. Chagas' disease in the Amazon Basin. II. Distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981; 75, 667-74.

Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira ACV, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95(1):97-9.

	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	 Grupo de Pesquisa em Doenças de Chega Dr. João Ribeiro Freire Técnicos de Referência: Ingrid de C. Ribeiro Vieira Dourado		
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP TÍTULO: REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> – PROTOCOLO DO GENE QUE CODIFICA A SUBUNIDADE II DA CITOCROMO OXIDASE (COII)				
Elaborado por: Débora Raysa T. de Sousa	Revisado e aprovado por:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td data-bbox="1002 645 1377 748"> Data de aplicação 25 de abril de 2019 </td> </tr> <tr> <td data-bbox="1002 748 1377 920"> Data da próxima revisão 25 de abril de 2020 </td> </tr> </table>	Data de aplicação 25 de abril de 2019	Data da próxima revisão 25 de abril de 2020
Data de aplicação 25 de abril de 2019				
Data da próxima revisão 25 de abril de 2020				

OBJETIVO

Descrever o procedimento da PCR – protocolo COII utilizado para o diagnóstico complementar da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e diferenciação de linhagens TcI, TcII e Zimodema 3 (Z3).

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.

CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial complementar.

RESPONSABILIDADES

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

POP'S RELACIONADOS

POP armazenamento

POP extração de DNA

POP PCR GPI

POP Sequenciamento

EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Jaleco

Luvas

Máscara

Touca

RECURSOS NECESSÁRIOS

Amostra

7.1.1. DNA extraído (conforme POP Extração de DNA)

Materiais

7.2.1. Microtubo (Eppendorf) de 0,2 mL e 1,5 mL.

7.2.2. Ponteiras 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%.

7.2.6. Erlenmeyer (100mL).

7.2.7. Proveta (100mL).

Equipamentos

7.3.1. Termociclador

7.3.2. Fonte de eletroforese

7.3.3. Agitador de tubos (Vortex)

7.3.4. Microondas

Reagentes, meios e soluções

7.4.1. Frasco com água ultrapura (H₂O UP).

7.4.2. Buffer de PCR 10x.

7.4.3. MgCl₂ 50mM.

7.4.4. Nucleotídeos dATP + dCTP + dTTP + dGTP 10mM.

7.4.5. Primer: TcMit 31 (5' – TAAATAATATATATTGTACATGAG- 3') 50mM.

7.4.6. Primer: TcMit 40 (5' – CTCATTGYCCATATATTGT- 3') 50mM.

7.4.7. Enzima Taq polimerase (Taq Polymerase Platinum) 5U.

7.4.8. Marcador de peso molecular (Diluir o marcador: 40 µL de água destilada + 10 µL de tampão de corrida + 10 µL do marcador de peso molecular).

7.4.9. Solução tampão para eletroforese (Diluir o TBE 10X para 1X: 100mL de TBE 10X + 900mL de água destilada).

7.4.10. Tampão de corrida.

7.4.11. Brometo de etídeo.

PROCEDIMENTOS

Mix da reação (PCR)

Obs. 1: As quantidades fornecidas a seguir correspondem a valores empregados para uma única amostra de DNA.

Obs. 2: A cada reação incluir uma alíquota de amostra comprovadamente positiva, além do controle negativo (apenas o mix).

8.1.1. Em um microtubo (Eppendorf), acrescentar os seguintes produtos:

Reagentes	Quantidade (µL)
H ₂ O	36,30
Buffer de PCR 10x	5,00
MgCl ₂	1,50
dNTP	1,00
TcMit 31	0,50
TcMilt 40	0,50
Taq DNA Polimerase	0,20
Total	45,00
DNA	5,00

Obs. 3: 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.

8.1.2. Após homogeneização, transferir 45 µL da mistura anterior para um microtubo (Eppendorf) de 0,2 µL.

8.1.3. Adicionar 5 µL do DNA extraído.

Ciclos térmicos

8.2.1. Introduzir os tubos do termociclador, programado para os seguintes ciclos de temperatura e tempo:

95°C	5 min	1X
95°C	30 seg	35X
48°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1X
4°C	infinito	

Controles

8.3.1. A cada reação adicionar uma amostra comprovadamente positiva e uma negativa (um Eppendorf com apenas um mix)

8.4 Eletroforese em gel de agarose

8.4.1. Para fazer um Gel 2%: pesar 2g de agarose; medir em uma proveta 100mL de TBE; adicionar em um erlenmeyer a agarose + TBE; levar ao microondas até diluir (aparência límpida).

8.4.2. Montar uma placa molde com um pente para formar os poços no gel;

8.4.3. Adicionar à mistura 5 µL de brometo de etídeo e logo, colocar essa mistura na placa e aguardar a polimerização;

8.4.4. Colocar a placa com gel na cuba de eletroforese;

8.4.5. Adicionar o tampão de eletroforese (TBE 1X);

8.4.6. Misturar 2 µL de tampão de corrida e 5 µL de DNA amplificado em cada poço no gel;

8.4.7. No primeiro poço, aplicar 5 µL da solução diluída do marcador de peso molecular;

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

8.5 Revelação

8.5.1. Fazer a leitura do gel no Transiluminador-UV;

8.5.2. A visualização de uma única banda de peso molecular 420 pb indicará a presença de DNA de *Trypanosoma cruzi* amplificado (PCR positiva)

PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

LIMITAÇÕES

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 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.

REFERÊNCIAS

1. Ávila HÁ, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: Diagnosis of chronic Chagas disease. Mol Biochem Parasitol 1991; 48:211-22.
2. Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SD, Galvão LM, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Exp Parasitol 1998; 88: 28- 33.
3. Sturm NR, Degraeve W, Morel CM, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequence: use in diagnosis of Chagas disease. Mol Biochem Parasitol 1989; 33: 205-14.

	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: 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)				
Elaborado por: Rosa Amélia G. Santana Henrique Silveira Laylah Magalhães Débora Raysa T. de Sousa Adaptado por: Arineia Soares da Silva	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;"> Data de aplicação 25 de abril de 2019 </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"> Data da próxima revisão 25 de abril de 2020 </td> </tr> </table>	Data de aplicação 25 de abril de 2019	Data da próxima revisão 25 de abril de 2020
Data de aplicação 25 de abril de 2019				
Data da próxima revisão 25 de abril de 2020				

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.

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.

CAMPO DE APLICAÇÃO

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

RESPONSABILIDADES

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

POP'S RELACIONADOS

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

EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Touca descartável, luvas de látex, máscara descartável, jaleco

RECURSOS NECESSÁRIOS

DNA extraído: A partir da extração por Kit ou caseira

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

rometo de etídio

PROCEDIMENTOS

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 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.

*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.

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)
H₂O	34,80
Buffer de PCR 10x	5,00
MgCl₂	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 de 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 μ L de tampão de corrida e 8 μ L de DNA amplificado em cada poço no gel

8.5.5. No primeiro poço do gel aplicar 5 μ L 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).

PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

Não se aplica

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 um em cada reação uma amostra de controle positivo (amostra de cultura positiva) e uma amostra de controle negativo (reagentes sem amostra, apenas água ultrapura).

REFERÊNCIAS

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.

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

ANEXOS

Não se aplica

	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: 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

OBJETIVO

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

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 0,5-1µL da amostra na reação de sequenciamento. O método não é recomendado para PCR com bandas inespecíficas ou com primer dímeros.

CAMPO DE APLICAÇÃO

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

RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

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).

EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

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

RECURSOS NECESSÁRIOS

Solução PEG (20% w/v PEG, 2,5M NaCl)

10g de Polietilenoglicol 8000

7,3g de NaCl

Adicionar 35 mL de H₂O miliQ

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

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

Antes de iniciar o procedimento:

Armazenar o etanol 80% a -20°C;

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

Procedimento:

Identificar os tubos 1,5 mL;

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.

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

Incubar a 37°C por 15 minutos no termobloco;

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

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

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

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

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

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

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.

PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

Não se aplica

LIMITAÇÕES

Não se aplica

REFERÊNCIAS

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.

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.

ANEXOS

Não se aplica.

	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	 Grupo de Pesquisa em Doenças de Chegas Dr. João Marcos Prado Instituto de Biologia, Unipar do Rio Negro, Manaus, AM
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – 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

OBJETIVO

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

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.

CAMPO DE APLICAÇÃO

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

RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

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).

EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Jaleco, calçado fechado, máscara, luvas, touca

RECURSOS NECESSÁRIOS

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 Terminator 3.1 (Buffer 5X e BigDye)

7.2.2- EDTA 125mM

7.2.3- Acetato de sódio a 3M

7.2.4- Etanol 70%

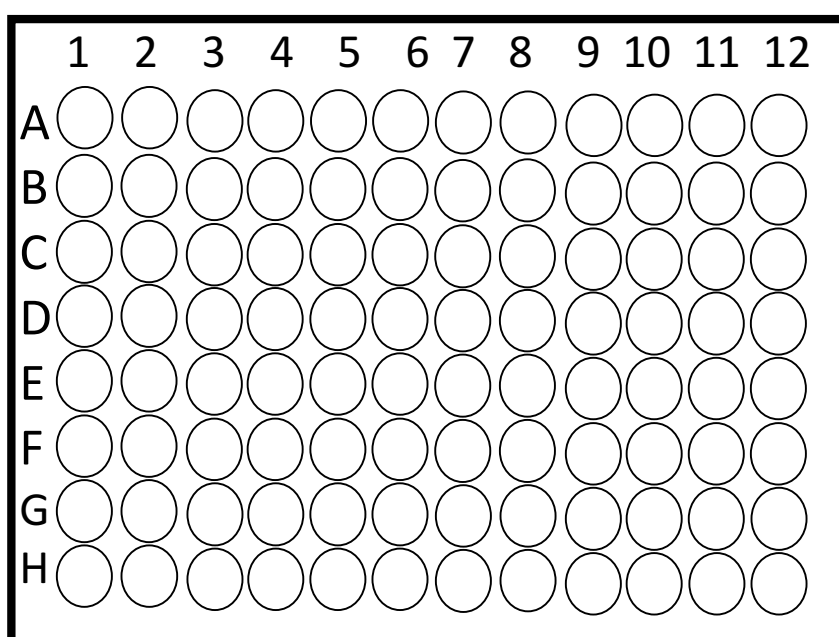
7.2.5- Formamida HI-DI (Highly deionized- Altamente deionizada)

PROCEDIMENTOS

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.



Placa com 96 poços

Reagentes do Mix	Quantidade 1x*
Água ultratrapura**	3,7µL
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 μ L.

*** 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	

Após terminar a reação no termociclador

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

Obs: Utilizar pipeta multicanal.

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

Inverter a placa manualmente e fazer um spin até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa 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 bater delicadamente por 8X, para retirar o excesso de etanol e fazer um spin de 1 minuto.

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.

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.

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.

PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

Não se aplica

LIMITAÇÕES

Não se aplica

REFERÊNCIAS

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>.

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.

ANEXOS

Não se aplica

7.1. Anexo II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Título do projeto: TRIATOMÍNEOS DO ESTADO DO AMAZONAS: DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL, BIOECOLOGIA E IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.

Patrocinador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

Nós, Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, Jorge Augusto de Oliveira Guerra e Rubens Celso Andrade da Silva Junior, pesquisadores da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, estamos convidando o senhor(a) /você/seu filho/seu familiar a participar de um estudo chamado “Triatomíneos do Estado do Amazonas: distribuição espacial, bioecologia e importância epidemiológica “. Esta pesquisa irá estudar os barbeiros, vetores da doença de Chagas, que rotineiramente costumam invadir as casas, porém, parte da população desconhece a doença e o barbeiro. Por isso, este trabalho propõe investigar o conhecimento das pessoas sobre a dinâmica de transmissão da doença de Chagas, identificar o quanto elas sabem sobre os vetores e conscientiza-las sobre as medidas preventivas para a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

a) O objetivo desta pesquisa é investigar a distribuição dos barbeiros dentro e fora das casas do estado do Amazonas, saber se esses barbeiros estão vivendo em ambientes humanos, se eles se alimentam de animais domésticos e o homem, além de estudar como esses barbeiros se relacionam com o parasita que causa a doença de Chagas.

b) Caso você participe do estudo será necessário responder a um questionário com 19 perguntas relacionadas a esta pesquisa, e preencher dados sobre endereço, escolaridade, data de nascimento, nome completo, profissão e local onde nasceu.

c) Para tanto, não precisará de deslocar para fora da sua residência, apenas responder ao questionário que durará no máximo 5 minutos.

d) Depois da entrevista será oferecido ao participante informativos sobre os barbeiros, conteúdo orientações para prevenção da doença de Chagas.

e) Caso decida aceitar, o participante será convidado a colaborar, coletando barbeiros que possam aparecer na sua residência. Lembrando que sua colaboração na busca de barbeiros NÃO é obrigatória.

f) É possível que, durante a entrevista, você sinta algum desconforto relacionado as perguntas ou tempo gasto para responde-las.

g) Alguns riscos relacionados podem ser: quebra de sigilo das informações fornecidas por extravio de ficha de entrevista; Apesar de receber orientações sobre captura de insetos, se houver contato direto, poderá desenvolver reação alérgica devido a picada do barbeiro; ao tentar capturar o barbeiro e ele for amassado, e houver contato de suas mãos com as fezes contaminadas com *Trypanosoma cruzi* há risco de contaminação com o *T. cruzi*.

h) Os benefícios esperados desta pesquisa são: conscientização da população sobre a dinâmica de transmissão da doença de Chagas; vigilância entomológica, pelos próprios moradores, sobre os barbeiros;

i) A pesquisadora: Dra. MARIA DAS GRAÇAS VALE BARBOSA GUERRA cujo número de telefone é: 99602-9498, responsável por este estudo estará disponível na gerência de entomologia, no endereço: Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000. Além disso, o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado estará à disposição do participante no endereço: Av. Pedro Teixeira, 25, Dom Pedro, Manaus-AM, 69082-000, também pelo telefone (92) 2127-3572 e e-mail cep@fmt.am.gov.br para esclarecer dúvidas que o senhor/a senhora/você/seu filho/seu familiar possa ter e dar as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Rubricas:

Participante da pesquisa _____

Pesquisador responsável: _____

7.2. Anexo III

Questionário sobre doença de Chagas

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

Título do Projeto: TRIATOMÍNEOS DO ESTADO DO AMAZONAS: DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL, BIOECOLOGIA E IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.

IDENTIFICAÇÃO

Data da investigação: ____/____/____

1. Nome do participante _____

1. **Data de Nascimento:** ____/____/____

2. **Idade:** _____

3. **Sexo:** M () F ()

4. **Raça/Cor:** () Indígena () Negro () Branco () Amarelo () Pardo

5. **Escolaridade:** () Alfabetizado () 1 a 4, () 5 a 8, () Ens. médio () superior C ()

6. **Endereço da Residência:** _____

7. **Parede da casa** () Alvenaria () madeira () palha

8. **Cobertura da casa** () telha amianto () Telha de alumínio () telha de barro () palha () outro _____

9. **Naturalidade:** _____

10. **Profissão:** _____

11. **Ocupação:** () Agricultor () Extrativista () Apicultor () Piscicultor () outros

12. **Estado civil:** () solteiro () Casado () união estável () viúvo

INFORMAÇÕES DO CONHECIMENTO E VULNERABILIDADE - DOENÇA DE CHAGAS

13. Já ouviu falar sobre Doença de Chagas? () sim () não

14. Sabe como se pega a doença? () sim () não

15. Se a resposta for sim: Como se pega: _____

16. Há história familiar para Doença de Chagas? () sim () não

17. Já ouviu falar do barbeiro ou piolho de piaçaba? () sim () não

18. Reconhece o barbeiro? () Sim () Não

19. Já encontrou barbeiro dentro de casa: () Sim () Não Fora da casa () Sim () Não

20. Se a resposta for sim onde? () cama () parede quarto () cozinha

21. Mora próximo da mata? () sim () não

22. Qual a distância da casa para a mata? () < 10 m () entre 11m e 50m () > 50m

23. Possui energia elétrica na casa? () sim () não

24. Possui água encanada () Sim () Não

25. Banheiro dentro da casa () Sim () Não

26. Entra na mata ? () Sim () Não

27. Frequenta sítio no fim de semana / feriado: () Sim () Não

28. Se sim com que frequência? Diariamente () uma vez por semana () uma vez por mês ()

29. Você já pernoitou na mata? () Sim () Não

30. Você dorme no sítio? () Sim () Não

31. Com que frequência? () Toda semana () todos feriados

32. Você tem o hábito de caçar? Sim () Não ()

33. Se a resposta for sim, com que frequência? _____

34. Consome de carne de caça: () Sim () Não se sim Qual ?

35. Consumo frutos de palmeira: () sim () não Se a resposta for sim quais : () Açaí () Bacaba () Patuá () Buriti

36. Você mesmo faz o suco: () Sim () Não Se a resposta for não. Onde você adquire o suco _____

37. Apresentar e entregar o folder

Convidar para coletar/ou avisar sobre o encontro de barbeiros no domicílio

7.3. Anexo IV

Material de divulgação: panfleto educativo sobre doença de Chagas

Orientações

Casas próximas as áreas de matas podem atrair esses insetos através do uso de luzes acesas.

Ao encontrar algum inseto parecido com o barbeiro, seguir as orientações abaixo:

1. Se o barbeiro estiver VIVO, colocá-lo em um recipiente como, vidro, caixa de fósforo, ou similar, deixando algum espaço para ele respirar.



2. Se o barbeiro estiver morto colocá-lo em um recipiente com tampa ou em um saco plástico.

NÃO DEVE: esmagar, apertar, bater ou matar o inseto de modo que seja espalhado seu conteúdo interno como por exemplo as fezes.

3. Caso você encontre algum exemplar de barbeiro na sua residência, pode comunicar à Fundação de Medicina Tropical pelo telefone 2127-3518. Ou nos avisar enviando mensagem via WhatsApp para nossa equipe pelo telefone (92) 99245-3180.



Organização

Gerência de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical

Maria das Graças Vale Barbosa Guerra
Nelson Ferreira Fé
Rubens Celso Andrade da Silva Junior
Laylah Kelre Costa Magalhães
Kenny Rodriguez de Sousa
Jéssica Vanina Ortiz
Débora Raysa Teixeira de Sousa
Joel Dantas
Emily de Sousa Moura
Amanda Bento dos Santos
Amanda Louise

Contato

Gerência de Entomologia/Fundação de medicina tropical FMT-HVD

Av. Pedro Teixeira, Dom Pedro, Manaus-AM

Telefone: 2127-3518

Celular: (92) 99245-3180

E-mail: mgvale@uea.edu.br



Grupo de Pesquisa em Doenças do Grupo Dr. João Maciel Freire
Fundação de Medicina Tropical Dr. João Maciel Freire

DOENÇA DE CHAGAS NO AMAZONAS



Conhecer para evitar

AMAZONAS
2019

A doença de Chagas:

1. É uma doença infecciosa causada por um parasito chamado *Trypanosoma cruzi*.
2. A principal forma de transmissão é através do contato com as fezes dos barbeiros contaminadas com o parasito (FIGURA 1).



FIGURA 1: Barbeiro defecando ao se alimentar de sangue (Fonte: Galvão, 2014)

Outras formas de transmissão:

1. Consumo de alimentos crus ou contaminados com fezes dos barbeiros. Exemplo: suco do açaí, bacaba etc.
2. Transfusão de sangue
3. Congênita (de mãe para filho)
4. Transplante de órgãos
5. Acidente de laboratório.

Quem são os insetos que transmitem a doença de Chagas?

São os Triatomíneos, conhecidos como Barbeiros ou piolho da piaçaba. Se alimentam de sangue de animais, inclusive do homem.

Existem insetos parecidos com os barbeiros, mas **não se alimentam de sangue** e não transmitem a doença. Abaixo estão imagens de barbeiros e de outros insetos parecidos:

São Barbeiros:



Rhodnius pictipes



Rhodnius robustus



Panstrongylus geniculatus



Não são Barbeiros:



(Fonte: Juberg et al, 2014)

Na Amazônia ainda não existem barbeiros que vivem dentro das residências, mas eles podem ser atraídos pela luz e ficam escondidos em frestas que encontram pela casa.

Os barbeiros da Amazônia geralmente vivem em:

- Palmeiras e/ou ninhos de pequenos mamíferos e aves.
- Tocais de animais



Fonte: <https://www.deviantart.com/...>

Importante saber:

Na fase inicial da doença de Chagas (fase aguda) os sintomas são similares aos da malária. O diagnóstico inicial é feito através do exame para malária.

A Fundação de Medicina Tropical é o centro de referência para o diagnóstico e tratamento da doença.

7.4. Anexo V

Ficha de registro de triatomíneos



FICHA DE RECEBIMENTO DE TRIATOMÍNEOS

GERÊNCIA DE ENTOMOLOGIA

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

INTRA/PERI: _____. COMODO: _____

TELEFONE: _____. DATA: _____

ESPÉCIE: _____.

Adulto: M () F (). NINFA: FASE DA NINFA: _____

CÓDIGO: _____

OBS: _____

7.5. Anexo VI

Parecer consubstanciado CEP

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TRIATOMÍNEOS DO ESTADO DO AMAZONAS: DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL, BIOECOLOGIA E IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.

Pesquisador: MARIA DAS GRAÇAS VALE BARBOSA GUERRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 08050118.5.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.903.414

Apresentação do Projeto:

No documento intitulado " PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1172672.pdf" postado em 27/08/2018, item resumo, lê-se: "Os triatomíneos são insetos de hábito hematófago, de grande importância de dentro de saúde pública, por incluírem espécies que colonizam os domicílios infectadas com o *Trypanosoma cruzi* agente etiológico da doença de chagas. Na Amazônia não há registro de triatomíneos que colonizem o domicílio. Todas as espécies encontradas, tem hábitos silvestres, essencialmente zoófilos, com pequena capacidade de dispersão pelo voo. Entretanto, diante das pressões antropológicas, tais como os desmatamentos, queimadas e outras agressões ecológicas, que destroem habitats naturais, se os hospedeiros se tomarem escassos, os triatomíneos podem fazer longos voos de dispersão para atingir um novo habitat, durante os quais mostram uma atração especial por luzes artificiais. Nesse processo espécies podem colonizar o extra e intradomicílio, passam a se alimentar do sangue de animais domésticos, e do homem, representando risco de instalação da Tripanossomíase domiciliar. Esse projeto tem como objetivo investigar aspectos sobre a distribuição espacial, bioecologia, interação de espécies de Triatomíneos com o *Trypanosoma cruzi* circulante no Estado do Amazonas. O estudo será realizado durante 4 anos, em parceria entre a Universidade do Estado do Amazonas –UEA, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado _ FMT-HVD e Fundação de Vigilância em Saúde – FVS. Será realizado em municípios do Estado do Amazonas, onde foram registrados surtos e casos isolados da doença de Chagas na sua forma aguda. Serão registradas a ocorrência

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

**FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"**



Continuação do Parecer: 2.903.414

de triatomíneos em ambientes domiciliares e extradomiciliares e será avaliado o potencial de infestação de ambientes humano. Serão investigadas a taxa de infecção natural para *T. cruzi* e fontes alimentares. Serão realizados ainda, treinamentos e orientações à população e aos agentes de saúde, sobre os triatomíneos e sua importância como vetores silvestres de *T. cruzi* na Amazônia".

Trata-se do Projeto : TRIATOMÍNEOS DO ESTADO DO AMAZONAS: DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL, BIOECOLOGIA E IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.

Pesquisador Responsável: MARIA DAS GRAÇAS VALE BARBOSA GUERRA

Serão considerados como desfecho primário:

- 1- Sensibilização da população em relação aos vetores da doença de Chagas;
- 2- Descrição dos aspectos da bioecologia dos triatomíneos coletados Identificação das linhagens circulantes próximo ao ambiente urbano da região metropolitana de Manaus;
- 3- Compreensão da dinâmica de transmissão da doença de Chagas no Amazonas.

Desfecho Secundário: O trabalho de sensibilização sobre a doença de Chagas e seus vetores poderá minimizar o contato da população com o *Trypanosoma cruzi*.

Hipótese:

O registro de barbeiros dentro das residências, vulnerabiliza a população para infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. O processo de urbanização nos municípios da região metropolitana de Manaus está aproximando a população do ciclo do *Trypanosoma cruzi*.

Tipo de Estudo: O estudo do tipo ecológico, de caráter descritivo transversal, a ser realizado no período de 2018-2022.

Metodologia

MATERIAIS E MÉTODOS: Local e período de estudo. O estudo será realizado durante 4 anos, através de parceria entre a Universidade do Estado do Amazonas –UEA, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado - FMT-HVD e Fundação de Vigilância em Saúde – FVS. Serão realizadas visitas presenciais nas áreas urbanas e periurbanas de municípios da Região Metropolitana de Manaus-RMM, e orientações através de videoconferências, através da

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

**FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"**



Continuação do Parecer: 2.903.414

telemedicina da UEA, aos agentes de saúde dos municípios do Estado do Amazonas, onde foram registrados casos isolados da doença de Chagas na sua forma aguda.

Procedimentos: A inclusão de triatomíneos será iniciada após o recebimento de espécimes pela gerência de entomologia doados por moradores de diferentes áreas da região metropolitana de Manaus. Haverá orientação com folder sobre os triatomíneos e a Doença de Chagas na Amazônia. Haverá visita ao local e registro dos triatomíneos. Será proposto a realização de palestras e orientações. Durante as visitas, os moradores serão convidados a participar do estudo. Caso concordem, deverão assinar o Termo de consentimento livre e esclarecido-TCLE, e realizada uma entrevista sobre o seu conhecimento a respeito de triatomíneos e a doença de Chagas. Será apresentada uma caixa-mostruário com as espécies de triatomíneos que ocorrem na região. Todos os participantes serão convidados e orientados para colaborar, coletando os espécimes de triatomíneos, encontrados no intra e peridomicílio de suas moradias, além de comunicar o laboratório de entomologia da FMT-HVD, o eventual registro de triatomíneos em suas casas. Durante as visitas serão ainda realizadas, buscas ativas nas áreas adjacentes ao intra, peri e extadomicílio dos moradores que entregarem os exemplares de triatomíneos. A ocorrência de triatomíneos em ambientes domiciliares e extradomiciliares e o potencial de infestação de ambientes humano, será avaliada através das seguintes amostras:

1. Triatomíneos recebidos na gerência de entomologia doados por moradores de diferentes áreas da região metropolitana de Manaus.
2. Triatomíneos entregue por moradores de áreas urbanas, periurbanas e rurais da região metropolitana de Manaus após orientação aos moradores;
3. Triatomíneos coletados por busca ativa no intra e peridomicílio de moradores de diferentes áreas da região metropolitana de Manaus que fizeram doação.

Treinamento de pessoal: Durante o estudo serão realizados treinamentos para capacitação de agentes de saúde e de moradores, no reconhecimento das diferentes espécies de vetores, que ocorrem nas suas regiões. Para os municípios fora da RMM, serão realizadas palestras via telemedicina da UEA. Mapeamento das áreas com registro de triatomíneos. Em cada local onde houver registro de triatomíneos será aferida a distância entre o imóvel e a área de mata mais próxima. As residências positivas para a ocorrência de vetores no intra ou peridomicílio serão georeferenciadas com GPS portátil, para a análise de distribuição espacial e correlação.

Serão utilizados os seguinte indicadores entomológicos:

- 1) Índice de infestação, domiciliar (= número de unidades domiciliares com presença de triatomíneos x 100, dividido pelo número de unidades domiciliares pesquisadas);

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

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.903.414

2) a densidade triatomínica domiciliar (número de exemplares de triatomíneos capturados dividido pelo número de unidades domiciliares pesquisadas);

3) o índice de infecção natural por *T. cruzi* e o índice de colonização (=número de unidades domiciliares com presença de ninfas x 100, dividido pelo número de unidades domiciliares pesquisadas).

Identificação dos Triatomíneos: Todos os espécimes coletados serão identificados através de chave taxonômica. Será realizada biologia molecular para identificação das linhagens de *Trypanosoma cruzi* utilizando as técnicas de PCR multiplex, COII, GPI; e Fusão de Alta Resolução (HRM) para fonte alimentar. A heterogeneidade de habitats será determinada a partir dos dados ecológicos dos locais de captura com dados do INPE e IBGE.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar aspectos sobre a distribuição espacial, bioecologia, interação de espécies de Triatomíneos com o *Trypanosoma cruzi* circulante no Estado do Amazonas.

Objetivos Secundários:

- 1- Avaliar a ocorrência de triatomíneos em ambientes domiciliares e extradomiciliares; 2- Descrever aspectos sobre a heterogeneidade de habitats;
- 3- Avaliar o potencial de infestação de ambientes humano;
- 4- Avaliar preferências alimentares. Descrever fatores que vulnerabilizam a população para a infecção chagásica em áreas de região metropolitana de Manaus;
- 4- Investigar aspectos da interação parasito-vetor;
- 5- Estimar a infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos, encontrados no intra e peridomicílio;

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

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.903.414

6- Investigar a susceptibilidade de espécies de triatomíneos frente às linhagens de *Trypanosoma cruzi* circulante no Estado do Amazonas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Apesar de receberem treinamento e todas as orientações sobre a identificação e manipulação dos vetores da doença de Chagas, tanto a equipe quanto a população podem ficar expostas às fezes contaminadas de triatomíneos. Também poderá ocorrer quebra de sigilo dos dados fornecidos pelos participantes do estudo durante a entrevista.

Benefícios: Educação em saúde para os profissionais e população sobre doença de Chagas e seus vetores. Vigilância entomológica pelos agentes de saúde e também pela população sobre os riscos da presença dos barbeiros em suas casas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa que busca o conhecimento sobre a distribuição espacial e temporal, de insetos vetores de doenças e poder demonstrar o comportamento desses organismos, e sua proximidade com humanos. No caso dos triatomíneos da Amazônia, estudos que investiguem a ocorrência desses insetos próximo ou dentro dos domicílios são de grande relevância considerando que nessa região ainda não há colonização desses insetos, a população não tem conhecimento desse tipo de inseto, e se formas imaturas forem encontradas dentro dos domicílios ou no peridomicílio, isso pode ser um alerta para a mudança de comportamento desses insetos na região.

O projeto conta com uma instituição proponente: Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado.

O número de participantes estimados para o projeto é de 500 entrevistados;

O projeto prevê duração de 4 anos.

Contará com orçamento de R\$ 29.867,75 (Vinte e nove mil, oitocentos e sessenta e sete reais e setenta e cinco centavos)

A proposta é relevante e conta com uma equipe qualificada e dentro do contexto, é plenamente factível. Entretanto, seu protocolo contém algumas questões que merecem maiores adequações, tais como: Falta anuência da Universidade do Estado do Amazonas -UEA, anuência da Gerência de

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

**FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"**



Continuação do Parecer: 2.903.414

Entomologia/FMT-HVD, Anuência da Fundação de Vigilância em Saúde-FVS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este protocolo traz anexado na PB os seguintes documentos:

1-FolhaDeRosto.pdf;

2-PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1172672.pdf;

3-projetoPlataformaBrasil.docx;

4-TCLE.docx

5-Cronograma com início em 01/03/2019 e término em 31/08/2022

6-Orçamento financeiro detalhado na PB no valor de R\$ 29.867,75 (vinte e nove mil, oitocentos e sessenta e sete reais e setenta e cinco centavos).

Recomendações:

Vide Conclusões e pendências

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A cabo da apresentação e análise das peças que compõem o protocolo, as conclusões são para que os interessados atendam os pontos abaixo:

PENDÊNCIAS/SOLICITAÇÕES

PENDENCIA 1

Solicita-se anexar na PB o questionário citado no escopo do projeto;

PENDENCIA 2

Segundo o protocolo " O estudo será realizado durante 4 anos, em parceria entre a Universidade do Estado do Amazonas –UEA, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado _ FMT-HVD e Fundação de Vigilância em Saúde – FVS". Solicita-se anexar na PB, as anuências destas instituições;

PENDÊNCIA 3-

Segundo o protocolo ainda: " Será realizado em municípios do Estado do Amazonas, onde foram registrados surtos e casos isolados da doença de Chagas na sua forma aguda". Solicita-se nomear os municípios e de que forma a pesquisa será realizada;

PENDÊNCIA 4

Quanto ao TCLE.docx, mesmo estando com texto claro, objetivo e de fácil entendimento, não está indicado o endereço, contato telefônico e horário de funcionamento do CEP. Solicita-se está adequação em conformidade com o (item IV.5.d, da Resolução CNS nº.466 de 2012).

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

**FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"**



Continuação do Parecer: 2.903.414

Diante do exposto, achamos que o projeto deva ficar em PENDENCIA, para que as correções apontadas sejam feitas.

Salvo melhor juízo!!

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente Protocolo teve seu desfecho de PENDÊNCIA. Com essa deliberação o (a) pesquisador (a) fica informado (a) que a partir desta data terá 30 (TRINTA) DIAS para atender as pendências apontadas, transcorrido esse prazo e as pendências permanecerem sem atendimento o Protocolo será arquivado, para atender a Resolução CNS nº 466/2012.

Ao reencaminhar o Protocolo de Pesquisa ao CEP, o pesquisador (a) deverá anexar ao Protocolo a FOLHA RESPOSTA, respondendo as pendências apontadas uma a uma, indicando sempre a pendência seguida da resposta e o local do Protocolo em que foi realizada a alteração. Se houver qualquer tipo de dúvida para responder às pendências, o pesquisador deve, pessoalmente, entrar em contato com o CEP/FMT-HVD.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1172672.pdf	27/08/2018 17:34:00		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	27/08/2018 17:32:31	Rubens Celso Andrade da Silva Junior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoPlataformaBrasil.docx	14/08/2018 18:26:40	Rubens Celso Andrade da Silva Junior	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	14/08/2018 18:16:00	Rubens Celso Andrade da Silva Junior	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

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

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.903.414

Não

MANAUS, 19 de Setembro de 2018

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))

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