

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JUCILIANE HAIDAMAK

**ADEQUAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DE
Trypanosoma cruzi CHAGAS, 1909 EM TRIATOMÍNEOS**

CURITIBA
2013

JUCILIANE HAIDAMAK

**ADEQUAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DE
Trypanosoma cruzi CHAGAS, 1909 EM TRIATOMÍNEOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração Parasitologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Larissa Reifur
Co-Orientadora: Dra. Débora do Rocio Klisiowicz

CURITIBA
2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Haidamak, Juciliane

Adequação de técnicas moleculares para a detecção de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 em triatomíneos. / Juciliane Haidamak. – Curitiba, 2013.

57 f.: il. ; 30cm.

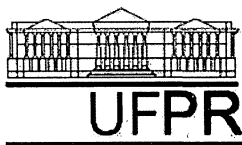
Orientadora: Larissa Reifur

Co-orientadora: Débora do Rocio Klisiowicz

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Chagas, Doença de. Título II. Reifur, Larissa. III. Klisiowicz, Débora do Rocio. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.2



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“ADEQUAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA A
DETECÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM TRIATOMÍNEOS DA
REGIÃO CENTRO NORTE DO ESTADO DA BAHIA”**

Por

JUCILIANE HAIDAMAK

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**


Prof^a. Dr^a. Larissa Reifur (presidente)


Prof^a. Dr^a. Débora do Rocio Klisiowicz


Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Socol


Prof^a. Dr^a. Márcia Kiyoe Shimada


Prof. Dr. Natal Jatai de Camargo

Curitiba, 11 de março de 2013.

A Deus, por tudo que me foi proporcionado,
à minha mãe Marlene pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele não chegaria onde cheguei, ele foi o meu refúgio nos momentos mais difíceis dessa trajetória.

À Dra. Larissa Reifur, pelos ensinamentos repassados durante todas as etapas do mestrado, pela paciência e dedicação comigo.

À Dra. Débora do Rocio Klisiowicz, pela oportunidade de ser sua aluna, pela confiança depositada e acima de tudo, pela amizade ao longo desse período.

À Me. Rosilda Aparecida Kovaliczn, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, que foi a primeira pessoa a acreditar que um dia eu poderia ser mestre. Um exemplo de profissional que ama o que faz.

Aos professores do departamento de Patologia Básica: Adriana Frohlich Mercadante, Andréa Emilia Marques Stinghen, Edilene Alcântara de Castro, Giseli Klassen, Ida Chapaval Pimentel, Ida Cristina Gubert, Juliana Ferreira de Moura, Larissa Alvarenga Magalhães, Luiz Felipe Caron, Patrícia do Rocio Dalzoto, Rosangela Clara Paulino, Silvio Marques Zanata e Vânia Aparecida Vicente pelas disciplinas ministradas e pelo conhecimento transmitido.

À minha mãe, Marlene Haidamak, por todas as palavras de carinho e motivação para a realização desse objetivo.

Ao Luiz Marcelo Priotto, pelo apoio, compreensão e ajuda durante todo esse tempo de mestrado.

A todos os funcionários da Secretaria da Saúde do Estado da Bahia (SESAB), pela ajuda nas coletas dos triatomíneos.

Ao Dr. Wanderson Duarte da Rocha e a Dra. Iriane Eger, pelas linhagens de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* cedidas para o estudo.

A todos os moradores das localidades do centro norte do estado da Bahia que gentilmente colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho e também à bióloga Núbia Domingos, parceira de todas as coletas realizadas nas áreas de estudo.

À Dra. Vanete Thomaz Soccol, à Dra. Márcia Kiyoe Shimada, ao Dr. Natal Jataí de Camargo e à Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro por disponibilizarem seu tempo para as correções da dissertação, sempre com o objetivo de melhorar o trabalho.

Às minhas queridas amigas Ana Karla Pazda e Adriane Zagonel, pela amizade e pelo incentivo de sempre.

Aos meus colegas do Laboratório de Entomologia Médica, Brenda Cecília Ribeiro, Regielly Cognialli, Tatiane Ferreira, Guilherme Damasio, por proporcionarem mais divertido o meu dia a dia no laboratório.

À secretária da Pós Graduação, Luciana Marques, por ser sempre prestativa em ajudar, além da sua amizade.

Aos demais colegas do Laboratório de Microbiologia, que contribuíram significativamente para a realização de cada etapa da minha dissertação.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

À UFPR, por ter me proporcionado a oportunidade de desenvolver este trabalho em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, por todo o apoio, além das condições técnicas para o seu desenvolvimento.

RESUMO

Em 2006, o Brasil recebeu a certificação internacional de eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, fornecida pela Organização Pan-Americana da Saúde, tendo o estado da Bahia como o último a receber a certificação. Apesar de o principal vetor ter sido eliminado, outras espécies assumiram o seu lugar e algumas delas apareceram infectadas com *Trypanosoma cruzi*. Atualmente, a Secretaria de Estado da Saúde da Bahia (SESAB) utiliza apenas o método direto a fresco para o diagnóstico de *T. cruzi* em conteúdo intestinal de triatomíneos. O método baseia-se na visualização de movimentação sugestiva do protozoário em fezes frescas, portanto, é um teste de baixa sensibilidade. A eficiência da detecção do parasito pode ser melhorada por técnicas moleculares. Neste trabalho foi realizada a adequação de duas técnicas, a amplificação em cadeia da polimerase (PCR) e a amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP) para otimizar a detecção de *T. cruzi* em fezes e urina de triatomíneos do centro norte do estado da Bahia. As otimizações das técnicas de PCR e LAMP possibilitou detectar uma célula de *T. cruzi* (0,5 fg de DNA) e 1 ng de DNA da amostra controle, respectivamente. Para as amostras teste, 51 triatomíneos da espécie *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata*, foram utilizadas para a detecção do DNA de *T. cruzi*. A técnica de PCR foi capaz de detectar 31,36 % (16/51) de positividade em insetos, sendo mais sensível que o método direto a fresco, onde o mesmo detectou apenas uma amostra, correspondendo a 1,96 % (1/51). O uso de técnicas de detecção mais sensíveis e específicas é importante para apresentar a real situação de triatomíneos infectados por *T. cruzi* e a partir dos resultados, obter dados epidemiológicos mais acurados sobre a doença de Chagas. A presença de *T. cruzi* em triatomíneos com potencial transmissão vetorial é um indicativo que o parasito pode estar presente em uma carga parasitária suficiente para manter seu ciclo biológico na região.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, método direto a fresco, PCR, LAMP, triatomíneo.

ABSTRAC

In 2006, Brazil received the international certification of elimination of transmission of Chagas disease by *Triatoma infestans*, provided by the Pan American Health Organization. Bahia was the last Brazilian state to receive this certification. Although the *Triatoma infestans* has been eliminated from Brazil, other species proliferated and some of them have been found infected with *Trypanosoma cruzi*. Currently, the Secretaries of State for Health (SSH) adopt the direct fresh method for the diagnosis of *T. cruzi* in triatomine gut contents. This method is of low sensitivity and specificity as it is based on the visualization of movements suggestive of a tripanosomatid. Considering that parasite detection can be improved by molecular techniques, in this work, the polymerase chain reaction (PCR) and the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) were used to optimize the detection of *T. cruzi* in feces and urine of triatomines. Using control DNA from an *in vitro* culture, it was possible to detect 0.5 fg of *T. cruzi* DNA, by PCR and 1 ng by LAMP. These reaction conditions were then used with DNA samples extracted from triatomines collected in the central north part of Bahia state. Out of the 51 triatomines collected, *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma brasiliensis* prevailed. Through PCR, 31,36 % (16/51) of the triatomines were positive for *T. cruzi* DNA, whereas the direct fresh method detected only one sample possibly positive, corresponding to 1,96 % (1/51). The LAMP technique probably needs more starting DNA in the sample to be able to amplify, thus it will be further optimized. In conclusion, the use of more sensitive and specific techniques is important to show the real situation of *T. cruzi* infected triatomines in Brazil. The presence of *T. cruzi* in triatomine species like *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculada*, which are potential vectors for *T. cruzi* transmission, is an indication that the parasite may be present in sufficient amounts to maintain their life cycle in Bahia.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, direct fresh method, PCR, LAMP, triatomine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - BIOMAS BRASILEIROS..... | 18 |
| FIGURA 2 - FIGURA ESQUEMÁTICA MOSTRANDO AS DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> (A) E <i>Trypanosoma rangeli</i> (B) E A LOCALIZAÇÃO DE CADA FORMA NO INSETO VETOR..... | 21 |
| FIGURA 3 - ESQUEMA MOSTRANDO OS PASSOS DA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR ALÇA (LAMP)..... | 26 |
| FIGURA 4 - DETECÇÃO VISUAL DOS PRODUTOS OBTIDOS APÓS AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR ALÇA (LAMP)..... | 27 |
| FIGURA 5 - MAPA DOS MUNICÍPIOS DA REGIÃO CENTRO NORTE DO ESTADO DA BAHIA (■) ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS DE TRIATOMÍNEOS..... | 28 |
| FIGURA 6 - COLETA DE TRIATOMÍNEOS EM DIFERENTES LOCAIS NOS MUNICÍPIOS DO CENTRO NORTE DO ESTADO DA BAHIA..... | 34 |
| FIGURA 7 - NINFAS E AS ESPÉCIES <i>Triatoma pseudomaculata</i> E <i>Triatoma brasiliensis</i> DE TRIATOMÍNEOS COLETADAS NO CENTRO NORTE DO ESTADO DA BAHIA..... | 34 |
| FIGURA 8 - AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> (A) E <i>Trypanosoma rangeli</i> (B) POR PCR PARA CONTROLE POSITIVO..... | 36 |
| FIGURA 9 - AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> POR PCR EM AMOSTRAS DO CONTEÚDO INTESTINAL DE TRIATOMÍNEOS..... | 38 |
| FIGURA 10 - DIFERENTES TESTES REALIZADOS PARA A TÉCNICA DE LAMP PARA OBTENÇÃO DE CONTROLE POSITIVO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> | 38 |
| FIGURA 11 - RESULTADO DA TÉCNICA LAMP PARA OBTENÇÃO DE CONTROLE POSITIVO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> | 39 |

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - TAMANHO DO PRODUTO AMPLIFICADO, SEQUÊNCIA E TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO (TM) DOS INICIADORES UTILIZADOS NA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma rangeli*. 30
- TABELA 2 - NOME, SEQUÊNCIA E TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO (TM) DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR ALÇA (LAMP) DE *Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma rangeli*. 32
- TABELA 3 - MUNICÍPIOS, REGIÕES E NÚMERO DE TRIATOMÍNEOS COLETADOS EM CADA LOCALIDADE NO ESTADO DA BAHIA. 33
- TABELA 4 - NÚMERO E ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS COLETADOS POR MUNICÍPIO DO CENTRO NORTE DO ESTADO DA BAHIA E RESULTADOS OBTIDOS PELO MÉTODO DIRETO A FRESCO E PCR PARA *Trypanosoma cruzi*. 37

LISTA DE SIGLAS

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

ITS – Espaçador interno transcrito

LAMP – Amplificação isotérmica mediada por alça

OPAS – Organização Pan-americana de Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RFLP – Polimorfismo dos fragmentos de restrição

rRNA – RNA ribossomal

SB - SYBRGreen®

SESAB – Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

sRNA – Pequeno RNA

SUCAM – Superintendência de Campanhas de Saúde Pública

TBE – Tampão Tris-borato-EDTA

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 14 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 Histórico da Doença de Chagas e seus vetores no estado da Bahia | 16 |
| 2.2 Morfologia e biologia de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> | 18 |
| 2.3 Epidemiologia da doença de Chagas | 20 |
| 2.4 Técnicas utilizadas para a detecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> | 20 |
| 2.5 Amplificação Isotérmica Mediada por Alça (LAMP, de Loop Mediated Isothermal Amplification) | 22 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 3.1 Coleta e identificação dos triatomíneos utilizados no estudo | 28 |
| 3.2 Método direto a fresco para pesquisa do conteúdo intestinal dos triatomíneos coletados | 29 |
| 3.3 Extração de DNA do conteúdo intestinal dos triatomíneos coletados | 29 |
| 3.4 Controles positivos de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> | 29 |
| 3.5 Amplificação em cadeia pela polimerase (PCR) de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> | 30 |
| 3.6 Amplificação Isotérmica Mediada por Alça (LAMP) | 31 |
| 4 RESULTADOS | 33 |
| 4.1 Coletas dos triatomíneos utilizados no estudo | 33 |
| 4.2 Identificação dos triatomíneos | 33 |
| 4.3 Método direto a fresco para pesquisa de tripanosomatídeos no conteúdo intestinal dos triatomíneos coletados | 35 |
| 4.4 Adequação da reação em cadeia da polimerase (PCR) para <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> | 35 |
| 4.5 PCR do DNA extraído do conteúdo intestinal dos triatomíneos coletados | 35 |
| 4.6 Adequação da técnica lamp para detecção de DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 38 |
| 4.7 LAMP do conteúdo intestinal dos triatomíneos | 39 |
| 5 DISCUSSÃO | 41 |
| 6 CONCLUSÃO | 46 |
| 7 PERSPECTIVAS | 47 |
| REFERÊNCIAS | 48 |
| APÊNDICE A | 56 |

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, que tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas em todo o mundo. Além disso, na América Latina mais de 25 milhões estão em área de risco e 1,8 a 2,5 milhões de pessoas são portadores da doença. Os pacientes chagásicos apresentam cardiopatia e/ou manifestações digestivas, implicando em assistência médicas e cirúrgicas que resultam em gastos e, conseqüentemente, em perdas econômicas para os órgãos de saúde (SILVEIRA *et al.*, 2002; WHO, 2012)

A epidemiologia da doença de Chagas está basicamente relacionada com a distribuição dos triatomíneos, que são os vetores do parasito, associados também a problemas econômicos (SILVEIRA, 2000; SCHOFIELD; GALVAO, 2009; FRIAS-LASSERRE, 2010). Os vetores do *T. cruzi* são insetos hematófagos, pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e a subfamília Triatominae. Atualmente, são descritas 140 espécies de triatomíneos, os quais estão classificados em cinco tribos e 15 gêneros (SCHOFIELD; GALVAO, 2009). A transmissão ocorre, principalmente, pelo contato das mucosas e/ou pele lesionada com fezes e urina de triatomíneos infectados com *T. cruzi* que permite a penetração do protozoário (SCHUSTER; SCHAUB, 2000; WHO, 2012).

Entre as décadas de 1960 e 1990, o governo federal manteve o Programa de Controle da doença de Chagas, que foi executado pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) e posteriormente Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Este programa obteve bastante êxito em vários estados brasileiros, mas em 1999, através da portaria nº 1399 do Ministério da Saúde, houve a descentralização das ações de controle de endemias transferiu as responsabilidades para os estados e municípios (VILLELA *et al.*, 2007). Desde então cada estado mantém programas de controle da doença de Chagas de acordo com a incidência da doença e da disponibilidade econômica.

Apesar de a Bahia ter sido um estado declarado como livre da transmissão vetorial de *T. cruzi* em 2006, o relato de triatomíneos infectados com *T. cruzi* encontrados no nordeste (SILVA, 1966; SHERLOCK; BRENER; ANDRADE, 1979; DIAS-LIMA; SHERLOCK, 2000; DIAS *et al.*, 2008; SANTANA KDE *et al.*, 2011; SARQUIS *et al.*, 2012) não deveria ser esquecido. A Secretaria da Saúde do Estado da Bahia (SESAB) mantém ativo programas de vigilância epidemiológica, na qual as

Secretarias de Estado da Saúde de cada município são instruídas a fazer a procura de triatomíneos no domicílio e peridomicílio. Normalmente, os insetos capturados são enviados para a FUNASA, onde são identificados e o conteúdo intestinal analisado pelo método direto a fresco. Esse método consiste na observação do conteúdo intestinal para qualquer movimentação que indique a presença de protozoários. Dentre os protozoários que possam se movimentar no conteúdo intestinal inclui *T. cruzi* e *T. rangeli*, que são morfologicamente semelhantes. A SESAB acredita não haver triatomíneos infectados com *T. cruzi*, pois todos os exames diretos do conteúdo intestinal dos triatomíneos têm sido negativos (comunicação pessoal)¹. Esses resultados negativos podem ocorrer devido à baixa sensibilidade da técnica em detectar uma baixa carga parasitária. Existem técnicas moleculares mais sensíveis e específicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP). Portanto, a associação do exame direto a fresco a uma dessas técnicas de biologia molecular pode contribuir significativamente para uma prevalência mais próxima da real de insetos infectados com *T. cruzi*. Este trabalho se faz de suma importância, pois a região nordeste do Brasil necessita de estudos entomológicos, além de um contínuo controle do vetor para prevenir a transmissão do protozoário causador da doença de Chagas (SILVEIRA; DIAS, 2011, SARQUIS *et al.*, 2012).

O presente trabalho é decorrente de uma parceria com municípios do centro norte do estado da Bahia, que surgiu de uma necessidade identificada por secretários de saúde que reconhecem que pouco se conhece a respeito da atual situação epidemiológica da doença de Chagas na região.

¹ Informação fornecida por técnicos da Secretaria da Saúde do Estado da Bahia (SESAB) em maio de 2012.

1.1 OBJETIVO GERAL

Adequar técnicas moleculares, PCR e LAMP, para melhorar a detecção de *T. cruzi* em fezes e urina de triatomíneos do centro norte do estado da Bahia.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar as espécies de triatomíneos capturadas no centro norte do estado da Bahia.
- Determinar por métodos moleculares a taxa de infecção dos triatomíneos infectados por *T. cruzi* e *T. rangeli*.
- Comparar o resultado da detecção de *T. cruzi* pelas técnicas PCR e LAMP com o método direto a fresco.
- Apresentar às secretarias de saúde e a comunidade científica os resultados sobre a eficácia das técnicas moleculares na identificação de *T. cruzi*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Em 1909, Carlos Chagas fez várias descobertas sobre *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. Descobriu o agente etiológico da doença, e o denominou de *T. cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz, seu mentor. Também determinou o inseto vetor, bem como os reservatórios domésticos e silvestres (DIAS *et al.*, 2000).

Apesar das descobertas de Carlos Chagas terem ocorrido no século XX, (FERREIRA; JANSEN; ARAÚJO, 2011) estudos paleoparasitológicos afirmaram que a infecção humana por *T. cruzi* e a doença de Chagas é tão antiga quanto à presença humana nas Américas, com aproximadamente 7000 anos. Estudos reforçam que a doença afetou populações da pré-história que viviam em cavernas e abrigos na região semiárida do Brasil Central e na região de fronteira dos Estados Unidos e México. A paleoparasitologia é uma ciência que vem contribuindo para os estudos de diversos hospedeiros e suas rotas de migração, facilitando assim o entendimento de várias doenças parasitológicas (GONÇALVES; ARAÚJO; FERREIRA, 2002).

Espécie de interesse médico e veterinário, o protozoário *T. cruzi*, tem como hospedeiros vertebrados, os mamíferos, incluindo seres humanos. Seus vetores, os triatomíneos, insetos hemípteros hematófagos, chamados vulgarmente de barbeiros, os quais pertencem aos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*, entre outros da família Reduviidae (REY, 2008).

Atualmente, os triatomíneos podem ser encontrados nas matas, quanto no peridomicílio e no domicílio humano. A ocupação antrópica sobre seu habitat natural forçou os insetos a se adaptarem quanto à procura de abrigo e de alimento. Além disso, as baixas condições socioeconômicas da população, caracterizadas por construções precárias, muitas vezes de pau a pique, favoreceram a domiciliação dos vetores e contribuíram para que a doença de Chagas se tornasse endêmica em algumas regiões da América Latina (SILVEIRA *et al.*, 2002).

As várias espécies de triatomíneos vetores são encontradas pelos diversos estados brasileiros, por exemplo, espécies do gênero *Rhodnius* foram encontradas no Maranhão (REBELO; BARROS; MENDES, 1998), focos silvestres de *Panstrongylus megistus* em Minas Gerais (SANTOS JUNIOR; DIOTAIUTI; DIAS, 2011), *Triatoma brasiliensis* foi relatado no Ceará (BORGES *et al.*, 2005), *T. sordida*, *P. megistus*, *Rhodnius neglectus* e *Triatoma tibiamaculata* foram observados em

São Paulo e na Bahia (SHERLOCK; BRENER; ANDRADE, 1979; SANTANA KDE *et al.*, 2011). Na Bahia, a maioria dos triatomíneos capturados em Salvador é da espécie *Triatoma tibiamaculata*, espécie silvestre que está em processo de domiciliação. Essa espécie tem as bromeliáceas, ninhos de marsupiais e de roedores como habitat natural (SHERLOCK; BRENER; ANDRADE, 1979; NASCIMENTO *et al.*, 1997; DIAS-LIMA; SHERLOCK, 2000).

2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS E SEUS VETORES NO ESTADO DA BAHIA

Dentre os estados brasileiros, o estado da Bahia apresenta a maior variedade de espécies de triatomíneos, sendo a maioria do gênero *Triatoma* e *Panstrongylus* (DIAS *et al.*, 2000). No total, foram registradas 25 espécies (GONÇALVES *et al.*, 2012) que foram divididas, de acordo com o risco de transmissão vetorial, em espécies de baixo, médio e de alto risco. Dentre as espécies que apresentam baixo risco de transmitir *T. cruzi* estão:

- *Cavernicola pilosa* Barber, 1937;
- *Panstrongylus diasii* Pinto & Lent, 1946;
- *Panstrongylus lenti* Galvão & Palma, 1968;
- *Parabelminus yurupucu* Lent & Wygodzinsky, 1979;
- *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965;
- *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923;
- *Rhodnius nasutus* Stål, 1859;
- *Rhodnius neglectus* Lent, 1954;
- *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967;
- *Triatoma petrocchiae* Pinto & Barreto, 1925;
- *Triatoma rubrofasciata* De Geer, 1773.

As espécies consideradas de médio risco são:

- *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811;
- *Panstrongylus lutzi* Neiva & Pinto, 1923;
- *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1958;

- *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923;
- *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964;
- *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002;
- *Triatoma sordida* Stål, 1859;
- *Triatoma tibiamaculata* Pinto, 1926;
- *Triatoma vitticeps* Stal, 1859.

Finalmente, os insetos que apresentam alta importância na transmissão vetorial incluem:

- *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835;
- *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911;
- *Triatoma infestans* Klug, 1834.

Entre os anos de 2001 a 2009, as principais espécies capturadas no estado da Bahia foram *T. sordida* e *T. pseudomaculata*. A espécie *T. infestans* foi encontrada somente em regiões semiáridas com áreas de caatinga (FIGURA 1) e florestas secas de alguns municípios. Há uma grande dificuldade, por parte da vigilância epidemiológica da Bahia, de eliminar focos residuais de *T. infestans* (GONÇALVES *et al.*, 2012), pois é uma espécie domiciliada e antropofílica, além de possuir as maiores taxas de infecção por *T. cruzi* (SILVEIRA, 2011).

A redução das outras espécies vetoras e a redução da colonização de casas por triatomíneos também é difícil de ser alcançada, pois condições ambientais favoráveis à manutenção do ciclo biológico destes insetos, como a temperatura ambiente, umidade e tipo de vegetação, favorecem a proliferação dos insetos (GONÇALVES *et al.*, 2012). Devido a essas condições para a manutenção do ciclo de *T. cruzi*, no interior da Bahia, muitos estudos sobre vetores foram realizados em diversas localidades (SHERLOCK; BRENER; ANDRADE, 1979).

Na década de 1950, uma campanha para o combate dos vetores com inseticidas foi promovida após levantamentos entomológicos terem apontado elevado número de triatomíneos dentro das residências de Salvador (COSTA, 1955). O controle dos triatomíneos, demonstrado pela redução de suas populações nos principais bairros da cidade, foi alcançado após aplicação frequente e intensa de inseticidas (LEAL; SHERLOCK; SERAFIM, 1965).

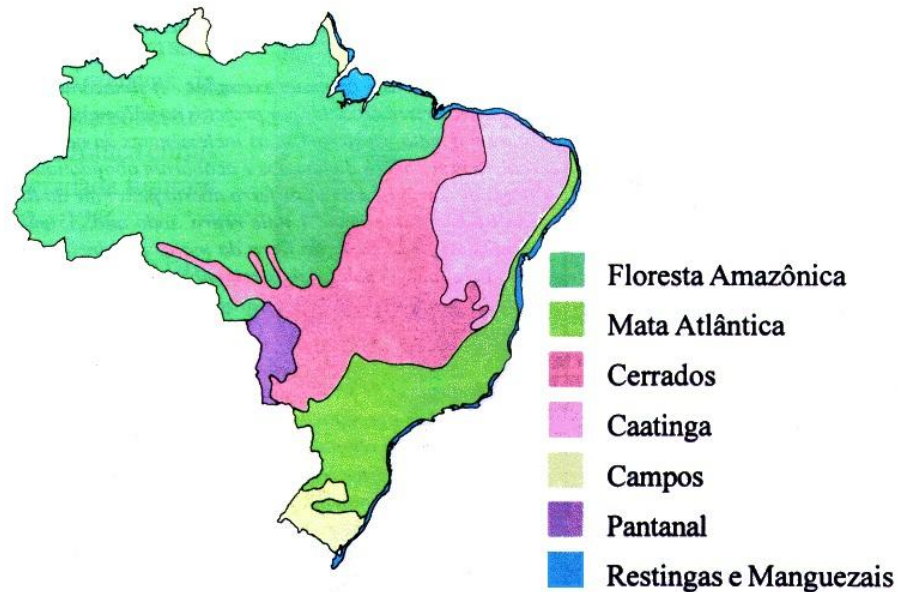


FIGURA 1 – BIOMAS BRASILEIROS. FONTE: <http://www.google.com.br>.

Mesmo após esta grande campanha, *P. megistus* infectados com *T. cruzi* persistiram nos bairros de Acupe de Brotas e Federação em Salvador (SILVA, 1966). Da mesma forma, outro estudo realizado em Salvador e publicado em 1974, relatou que dentre os 601 exemplares de *P. megistus* e *T. rubrofasciata* coletados, 16 % estavam infectados com *T. cruzi* pelo método direto a fresco (SHERLOCK; BRENER; ANDRADE, 1979).

Em 2006, o Brasil recebeu da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) a certificação de área livre da transmissão vetorial pelo *T. infestans*, após intenso trabalho de combate ao vetor. É interessante ressaltar que o estado da Bahia foi o último a receber a titulação livre de transmissão (BRASIL, 2006) Porém, ainda apresenta focos residuais de *T. infestans*. Noventa e três de seus municípios foram classificados como municípios que apresentam o vetor ou que são áreas de risco para a doença de Chagas (BRASIL, 2005). A título de curiosidade, outros países da América do Sul que igualmente apresentavam *T. infestans* obtiveram sucesso no controle desse vetor (SILVEIRA, 2000).

2.2 MORFOLOGIA E BIOLOGIA DE *Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma rangeli*

O hemoflagelado *T. cruzi*, pertencente à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida, possui as mesmas organelas de uma célula eucariótica e adicionalmente possui o cinetoplasto, uma organela que contém o DNA mitocondrial denominado de kDNA (REY, 2008). A espécie *T. cruzi* possui várias formas, como a

tripomastigota, de morfologia foliácea, comprimento de 16 µm a 20 µm, presente no sangue de hospedeiros mamíferos infectados (GARCIA; AZAMBUJA, 1991; KOLLIEN; SCHAUB, 2000). A forma amastigota é arredondada, intracelular e se multiplica nos tecidos (SILVEIRA *et al.*, 2002).

Após o repasto sanguíneo, no intestino médio do inseto, denominado pró-mesêntero, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* transformam-se em epimastigotas e alguns em esferomastigotas e amastigotas (GARCIA; AZAMBUJA, 1991; CARVALHO *et al.*, 1997; KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Na parte posterior do intestino, o pós-mesêntero, as formas epimastigotas sofrem divisão binária (GONZALEZ; AZAMBUJA; GARCIA, 1998) e no proctodeo, transformam-se em tripomastigotas metacíclicas. Essas últimas são eliminadas com as fezes e urina do inseto e são capazes de infectar hospedeiros vertebrados (GARCIA; AZAMBUJA, 1991; KOLLIEN; SCHAUB, 2000) (FIGURA 2A).

A espécie *T. rangeli* também é polimórfica e semelhante ao *T. cruzi* (DIAS *et al.*, 2007a). O *T. rangeli* difere de *T. cruzi* no ciclo de vida e por não ser patogênico para os humanos e animais (WATKINS, 1971; GUHL; VALLEJO, 2003; VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009). Após serem ingeridas pelo inseto, as formas tripomastigotas de *T. rangeli*, presentes no pró-mesêntero se diferenciam em epimastigotas no pós-mesêntero. No proctodeo do inseto vetor as epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas e epimastigotas invadem a hemolinfa completando o seu desenvolvimento em tripomastigotas metacíclicas nas glândulas salivares (WATKINS, 1971; HECKER; SCHWARZENBACH; RUDIN, 1990; GARCIA *et al.*, 1994; MELLO *et al.*, 1995) (FIGURA 2B).

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* são semelhantes e podem ser encontradas na porção final do intestino dos triatomíneos e no sangue de mamíferos, inclusive nos humanos (VALLEJO *et al.*, 1988; GUHL; VALLEJO, 2003; DIAS *et al.*, 2007a; PAVIA *et al.*, 2007; FU *et al.*, 2011). O exame do conteúdo intestinal por meio da observação da mobilidade do parasito ao microscópio de luz branca não é recomendado, pois podem ser encontrados tanto *T. cruzi* quanto *T. rangeli* (VALLEJO *et al.*, 1988; MAIA DA SILVA *et al.*, 2007; YEO *et al.*, 2007; MAIA DA SILVA *et al.*, 2008). É necessário, portanto, a correta identificação destes protozoários devido à elevada importância para o estudo da epidemiologia da doença de Chagas (MACHADO *et al.*, 2000).

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Inúmeros fatores promovem a manutenção do ciclo de vida de *T. cruzi*. Dentre eles está a impossibilidade de eliminar o ciclo silvestre, decorrente da existência de uma grande quantidade de reservatórios silvestres e domésticos (SILVEIRA *et al.*, 2002). A baixa renda familiar é outro fator importante que normalmente acomete a população que vive em áreas de risco, pois nessas áreas predominam habitações precárias (casas com ausência de forro, presença de frestas e telhado feito com folhas de palmeiras), que favorecem a colonização dos insetos vetores. Ressalta-se ainda a falta de investimentos em melhoria da qualidade de vida, por parte governamental (DIAS *et al.*, 2008; MALAFAIA; RODRIGUES, 2010).

Outros fatores também são necessários para que a transmissão do *T. cruzi* ocorra em condições naturais. Primeiramente, deve haver aproximação física dos reservatórios mamíferos ao vetor infectado. Posteriormente, variáveis dependentes do vetor influenciam a transmissão, como seu grau de antropofilia, tempo entre o repasto sanguíneo e a defecação, número e quantidade de evacuações e o número de parasitos eliminados com as fezes ou urina. O tempo entre o repasto e a defecação é de elevada importância, pois aqueles triatomíneos que defecam imediatamente após o repasto ou durante, como *T. infestans* e *P. megistus*, são mais eficazes na transmissão. Por outro lado, triatomíneos que defecam minutos depois do repasto, como *Triatoma vitticeps*, têm pouca ou nenhuma importância na transmissão. Além disso, a infecção depende do percentual de formas de *T. cruzi* infectantes nas fezes do barbeiro e sua capacidade de penetração no hospedeiro vertebrado, bem como da intensidade do prurido causado pela picada, levando o indivíduo a coçar-se e conduzir o parasito ao local da picada ou às mucosas (SILVEIRA *et al.*, 2002).

2.4 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma rangeli*

Por o diagnóstico por microscopia de luz branca ser pouco sensível e específico (VALLEJO *et al.*, 1988; YEO *et al.*, 2007; MAIA DA SILVA *et al.*, 2008) surgiu à necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias para a diferenciação

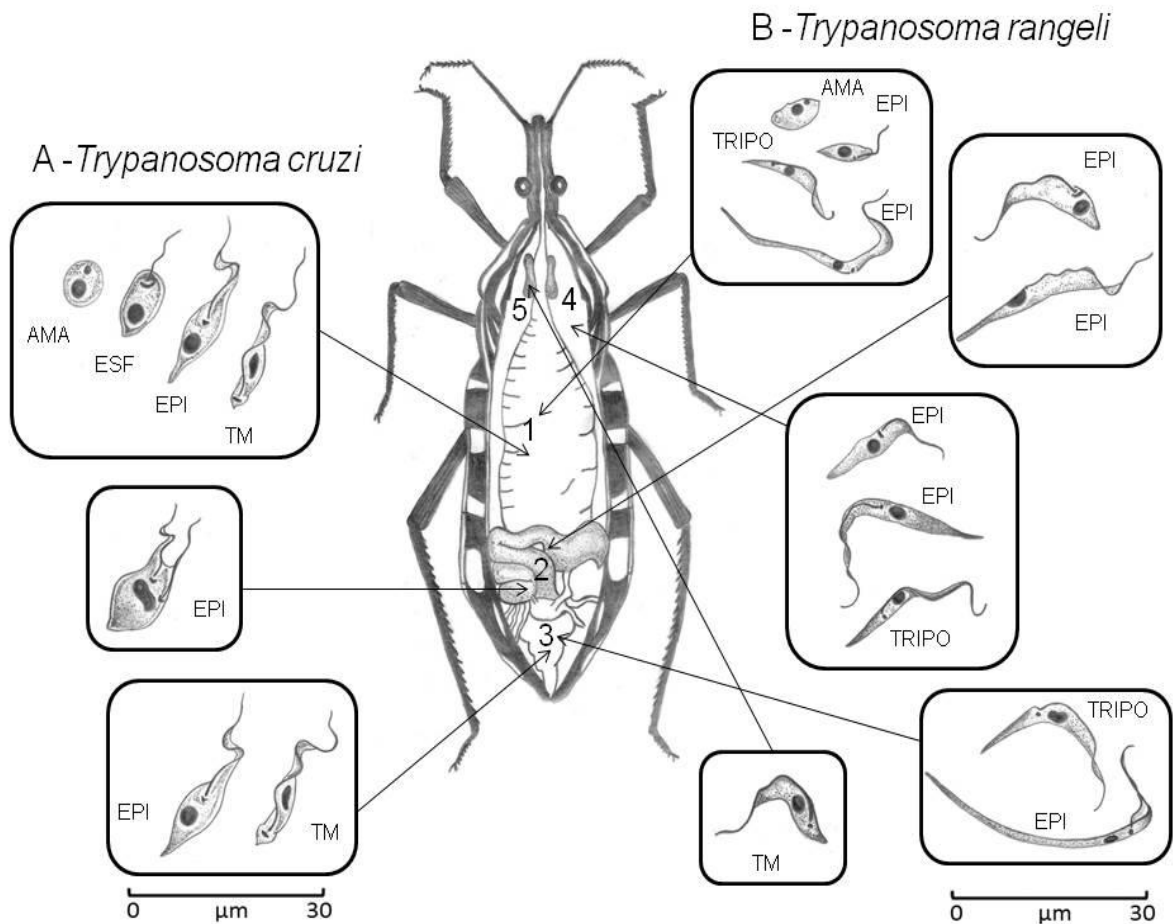


FIGURA 2 - FIGURA ESQUEMÁTICA MOSTRANDO AS DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE *Trypanosoma cruzi* (A) E *Trypanosoma rangeli* (B) E A LOCALIZAÇÃO DE CADA FORMA NO INSETO VETOR. 1 - Pró-mesêntero: amastigota (AMA); esferomastigota (ESF); epimastigota (EPI); tripomastigota (TRIPO); tripomastigota metacíclica (TM). 2 - Pós-mesêntero: epimastigota (EPI). 3 - Proctodeo: epimastigota (EPI); tripomastigota (TRIPO); tripomastigota metacíclica (TM). 4 - Hemolinfa: epimastigota (EPI), tripomastigota (TRIPO). 5 - Glândulas salivares: tripomastigota metacíclica (TM). Fonte: adaptado de carvalho *et al.* (1997).

de *T. cruzi* e *T. rangeli* (VALLEJO *et al.*, 1988; DIAS *et al.*, 2007a). Técnicas utilizando a biologia molecular vêm contribuindo para a melhora no diagnóstico e na diferenciação dos parasitas. A PCR, usando como alvos DNA do cinetoplasto, espaçador interno transcrito (ITS), subunidade 5,8S do DNA ribossomal e DNA codificante de histonas H2A/SIRE e um pequeno RNA (snoRNA-C11), mostrou ser extremamente útil no diagnóstico específico de *T. cruzi* e *T. rangeli* (MACHADO *et al.*, 2000; BELTRAME-BOTELHO *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2007a; PAVIA *et al.*, 2007; BOTERO *et al.*, 2010).

Muitas outras técnicas foram exploradas no diagnóstico de tripanosomas, como as que utilizam a lise do complemento, anticorpos monoclonais, aglutinação

da lectina (STEINDEL *et al.*, 1991), análise isoenzimática, enzimas de restrição, sequenciamento (MASIGA *et al.*, 1992; MAJIWA *et al.*, 1994; GARSIDE; GIBSON, 1995), polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), *Southern blot* (MACHADO *et al.*, 2000; DIAS *et al.*, 2007a; PAVIA *et al.*, 2007; BOTERO *et al.*, 2010) e mais recentemente a técnica de amplificação mediada por alça (LAMP) (KUBOKI *et al.*, 2003; NJIRU *et al.*, 2008a; THEKISOE *et al.*, 2010). Apesar de a técnica LAMP ser utilizada por vários pesquisadores desde 2000, é considerado uma técnica relativamente nova. Além disso, o processo pelo qual a amplificação ocorre é intrincado e a leitura dos resultados é diferenciada.

2.5 AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR ALÇA (LAMP, DE LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION)

A amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP) é uma técnica da biologia molecular, que alia rapidez, especificidade e simplicidade (NOTOMI *et al.*, 2000; NJIRU *et al.*, 2008a). Somente devido ao fato da amplificação ocorrer em condições isotérmicas o seu custo econômico é mais baixo que outras técnicas mais conhecidas como a PCR ou RFLP, pois não necessita de equipamentos sofisticados, como um termociclador (EIKEN, 2005). Por ser uma técnica com sensibilidade e especificidade muitas vezes superior à da PCR (HONG *et al.*, 2004; PARIDA *et al.*, 2005; POON *et al.*, 2006; OHTSUKI *et al.*, 2008; THEKISOE *et al.*, 2010) a LAMP oferece excelente custo benefício.

Desde que foi publicada, a LAMP já foi utilizada para a identificação de bactérias, vírus, fungos e protozoários provenientes de amostras de humanos, animais e plantas. Exemplos incluem *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* e *M. intracellulare*, *Brucella* spp, vírus da influenza A, *Fusarium graminearum*, *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium* (IWAMOTO; SONOBE; HAYASHI, 2003; KUBOKI *et al.*, 2003; MARUYAMA *et al.*, 2003; POON *et al.*, 2005; SEKI *et al.*, 2005; OHTSUKI *et al.*, 2008; ABD-ELSALAM *et al.*, 2011; QU *et al.*, 2013). A LAMP também já foi utilizada para a quantificação da carga viral em amostras clínicas infectadas por vírus-7 da herpes humana (YOSHIKAWA *et al.*, 2004) e vírus da influenza H1- H3 (POON *et al.*, 2005).

Na parasitologia, a LAMP está sendo aplicada para identificar subespécies de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma congolense* (KUBOKI

et al., 2003; NJIRU *et al.*, 2008a). Além disso, mostrou resultados superiores à PCR na detecção de *T. cruzi* e *T. rangeli* em *Rhodnius pallescens*, baseando-se na amplificação da região 18S do RNA ribossomal (rRNA) e do snoRNA, respectivamente (THEKISOE *et al.*, 2010).

A reação de LAMP utiliza uma DNA polimerase derivada de *Bacillus stearothermophilus*, chamada *Bst* DNA polimerase, que pode gerar 10^9 - 10^{10} cópias de DNA em 15 a 60 minutos. Essa polimerase tem a vantagem, em relação às demais, de fazer o deslocamento das fitas de DNA durante a amplificação e de ser utilizada isotermicamente (a uma temperatura entre 60 a 65 °C). Além disso, a reação e a detecção do produto amplificado podem ser realizadas em uma única etapa (NOTOMI *et al.*, 2000).

No mínimo, um conjunto de quatro iniciadores é necessário para a reação. O iniciador interno montante (FIP, de *forward inner primer*), F3, B3 e o iniciador interno jusante (BIP, de *backward inner primer*), que são desenhados a partir de seis regiões do DNA a que se quer amplificar (FIGURA 3). Essas regiões complementares do DNA alvo são conhecidas como F3c, F2c e F1c na extremidade 3' e B1, B2 e B3 na extremidade 5' (EIKEN, 2005).

No momento em que a enzima *Bst* DNA polimerase é adicionada à reação contendo o DNA alvo e aos iniciadores, inicia-se a síntese de um filamento de DNA, a partir da porção F2 do iniciador FIP (FIGURA 3 - passo1). Em seguida, o iniciador F3, que é mais curto e presente em concentração inferior a FIP, lentamente pareia a F3c, proporcionando a síntese de um fragmento complementar que vai deslocando o fragmento amplificado por FIP (passo 2). A fita dupla completa é formada a partir da fita de DNA sintetizada pelo iniciador F3 (passo 3). A fita deslocada no passo 2, agora livre, forma uma alça na extremidade 5' devido a região F1c ser complementar a F1 (passo 4). Esta fita com a alça na extremidade 5', chamada fita-1 simples, oferece um sítio para o pareamento do iniciador BIP (passo 4), de onde ocorre a síntese de um filamento. Semelhantemente ao descrito acima para F3, o pareamento sequencial do iniciador B3 promove síntese de outro filamento (passo 4), que desloca o filamento recém-sintetizado por BIP, resultando em uma fita dupla completa, a partir de B3 (passo 5). O filamento deslocado no passo 4, indicado no passo 6, forma duas alças, uma em cada extremidade, adquirindo formato de haltere (estrutura 6). Esta estrutura 6, denominada de estrutura de partida para a amplificação cíclica é auto iniciadora, pois por si só cria um ponto (F1) para início de

nova síntese de DNA. A nova fita de DNA abre a alça formada por B1 e B1c, formando o duplex mostrado em 7. A partir de 7, a reação toma 2 caminhos, a amplificação cíclica (II) e a fase de alongamento (III). O produto formado pela extensão de FIP (em 7) é liberado e retorna para a fase II de amplificação cíclica sob a forma 11. A estrutura 11, complementar a 6, também é uma estrutura em haltere autoiniciadora, que dá origem ao produto 12. Quando BIP pareia em 12, há formação da molécula 6, que é a estrutura de partida da amplificação cíclica e o processo se repete ciclicamente.

A partir das estruturas autoiniciadoras em haltere (6 e 11) surgem as estruturas 7 e 12, a partir de FIP e BIP, respectivamente. Estas duas estruturas são iniciadoras da fase de alongamento é reciclagem (passo III). A fase de alongamento consiste em gerar estruturas complexas muito longas, denominadas de estruturas em couve-flor (14 e 15). A partir de 7 (o mesmo ocorre para 12) FIP favorece síntese de novo fragmento (não mostrado na figura) que pareia com o molde (verde) e desloca a fita bege. Quando esta fita bege é deslocada (mostrada em 8) há formação de uma alça com B1c e B1 de sua extremidade, criando um sítio de ligação para a *Bst* polimerase iniciar uma síntese a partir de B1 (não indicada na figura). Quando este fragmento, iniciado a partir de B1, vai sendo polimerizado, ele desloca o fragmento 11 que entra na fase cíclica. Ao fragmento 8 resultante, na alça B1c/B1, liga-se BIP (passo 8). A fita promovida por BIP alonga-se até B1c. Neste momento, há deslocamento da fita externa que permanece ligada ao complexo, pela dobradiça B2c, e forma uma estrutura em grampo, com duas alças, a F2 e a B2c (passo 9). Ao redor destas duas novas alças formadas, ocorre nova síntese, originando a estrutura 10, que serve de molde para BIP, repetindo os ciclos (passo 10). Os iniciadores F e B podem ser adicionados à LAMP, intensificando o número de ampliações (passos 6; 9; 10; 11; 14 e 15).

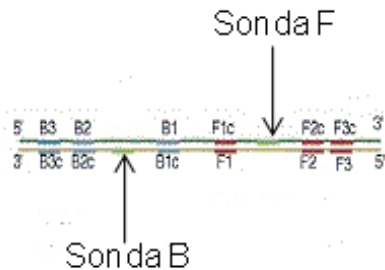
O resultado da LAMP pode ser visualizado após separação dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose, coloração do gel por brometo de etídio e visualização sob luz ultravioleta, do padrão típico em escada dessa técnica, da mesma forma que os produtos de uma PCR. No entanto, outros métodos foram criados para eliminar a necessidade da utilização de eletroforese em gel, para diminuir o custeio da técnica e o tempo de leitura dos resultados (NOTOMI *et al.*, 2000; IWAMOTO; SONOBE; HAIASHI, 2003; NJIRU *et al.*, 2008a).

O primeiro método criado para visualizar o produto da LAMP foi o da turbidez. Durante a síntese do DNA, íons de pirofosfato são liberado de trifosfato desoxirribonucleotídeos (dNTPs) na forma de subproduto, esses íons de pirofosfato reagem com íons de magnésio provenientes do tampão da reação, dando origem a um precipitado que torna a solução turva, indicando a amplificação do DNA (MORI *et al.*, 2001) (FIGURA 4A). Porém, este modo de visualização dos resultados não é simples, pois muitas vezes a turbidez é quase imperceptível, fazendo-se necessária experiência e olhos treinados por parte do avaliador (WASTLING *et al.*, 2010). O emprego de materiais fluorescentes, como o SYBR Green[®] I (SB), facilitou a leitura e a quantificação do resultado da reação LAMP. Os fluoróforos presentes no SB ligam-se em toda a dupla fita formada, emitindo fluorescência, e o resultado pode ser visualizado a olho nu e/ou com o auxílio de um transiluminador ultravioleta (FIGURA 4B e C) (IWAMOTO; SONOBE; HAYASHI, 2003; PARIDA *et al.*, 2005).

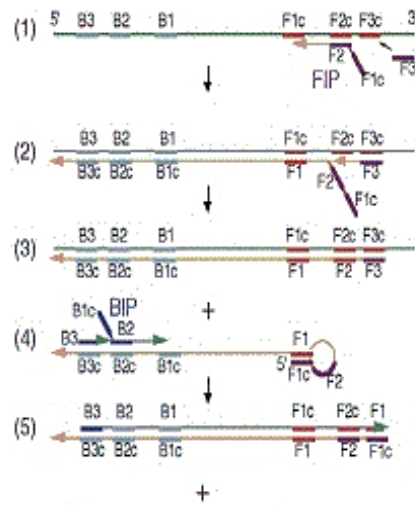
Existem ainda outras duas maneiras de avaliar o produto LAMP, como a adição de azul de hidroxinatól e a adição de calceína com cloreto de manganês (MnCl₂). Comparando estas duas técnicas com a avaliação da turbidez e a adição de material fluorescente, observou-se que o azul de hidroxinaftol demonstrou ser mais eficaz e barato dentre os demais, pois a mudança da cor violeta para o azul foi de fácil interpretação a olho nu. A calceína com cloreto de manganês (MnCl₂) diminuiu a sensibilidade da reação e a mudança de coloração foi quase imperceptível. O material fluorescente Quant-iT PicoGreen[®], possui custo econômico elevado e a visualização por turbidez foi desconsiderada, pois necessitou de mais precisão por parte dos observadores e também porque não foi positiva para todas as amostras (WASTLING *et al.*, 2010).

I. Etapa inicial do DNA a ser amplificado

Iniciadores e sondas da LAMP



Iniciador (FIP): 5' F1c e F2
 Iniciador (BIP): 5' B1c e B2
 Iniciador F3: 5' F3
 Iniciador B3: 5' B3



III. Alongamento e reciclagem

II. Amplificação cíclica

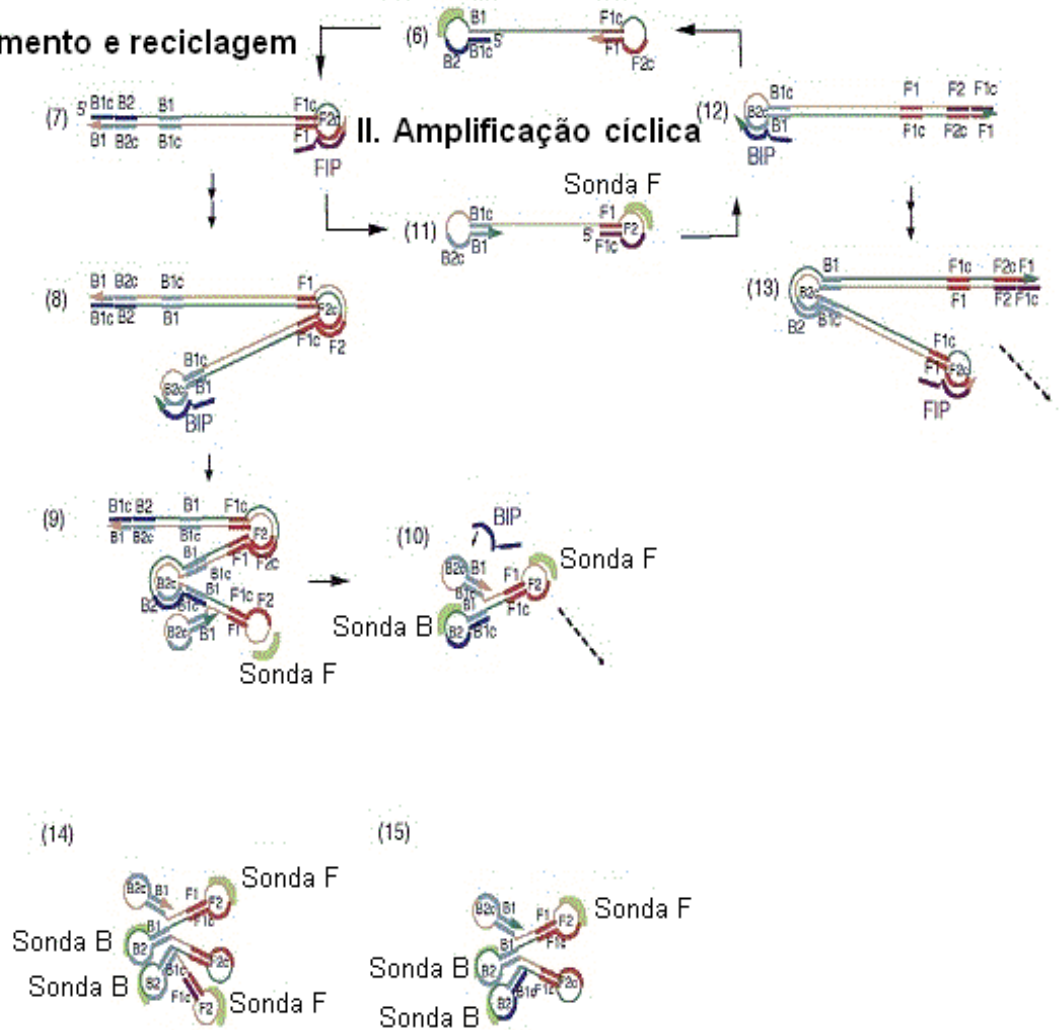


FIGURA 3 - ESQUEMA MOSTRANDO OS PASSOS DA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR ALÇA (LAMP). I - Etapa inicial do DNA a ser amplificado. II - Etapa de amplificação cíclica. III. Etapa de alongamento e reciclagem. FONTE: adaptado MORI *et al.* (2006).

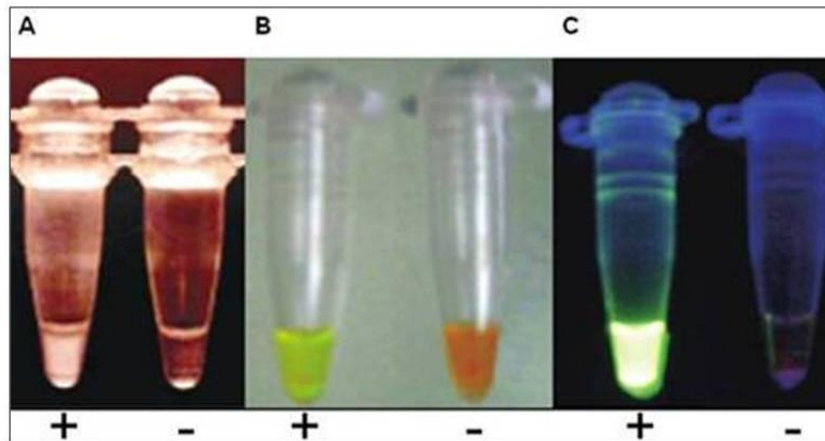


FIGURA 4 - DETECÇÃO VISUAL DOS PRODUTOS OBTIDOS APÓS AMPLIFICAÇÃO ISOTERMICA MEDIADA POR ALÇA (LAMP). A - Visualização de turbidez indicando amplificação do DNA em resultado positivo (+) ao lado da não amplificação em resultado negativo (-). B - Visualização a olho nu na presença de material fluorescente, coloração amarelo-esverdeada em resultado positivo (+); coloração laranja em resultado negativo (-). C - Visualização com transiluminador ultravioleta das mesmas amostras mostradas em (B); amostra verde fluorescente (+); amostra sem fluorescência (-). FONTE: <http://www.loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html> e PARIDA *et al.* (2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS TRIATOMÍNEOS UTILIZADOS NO ESTUDO

Antes do trabalho de campo foram realizadas reuniões com as autoridades da SESAB e o reconhecimento da área a ser estudada a fim de otimizar as coletas dos triatomíneos, que ocorreram em maio de 2012, nos municípios de Senhor do Bonfim, Antônio Gonçalves, Andorinha, Pindobaçu, Filadélfia e Irecê no estado da Bahia (FIGURA 5).

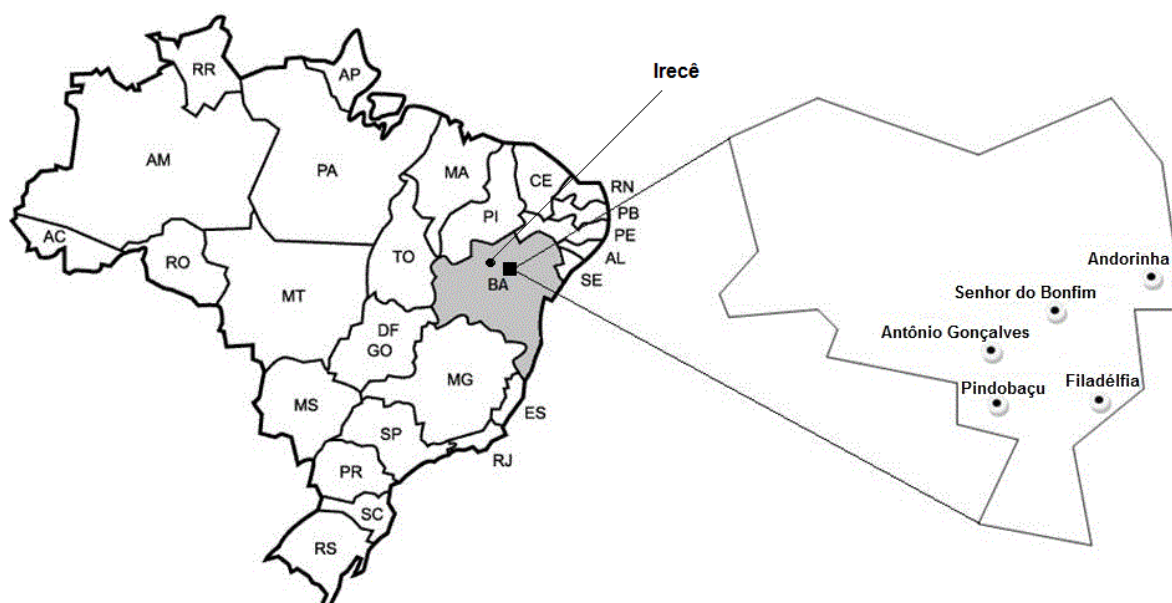


FIGURA 5 – MAPA DOS MUNICÍPIOS DA REGIÃO CENTRO NORTE DO ESTADO DA BAHIA (■) ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS DE TRIATOMÍNEOS. O esquema ampliado indica os municípios de Pindobaçu, Antônio Gonçalves, Senhor do Bonfim, Andorinha e Filadélfia. À esquerda, o município de Irecê (•).

Ninfas e adultos foram coletados com auxílio de pinças e acondicionados em caixas de papelão (4,5 x 3,2 x 1,2 cm). Os insetos foram encaminhados vivos, com a autorização da SESAB, em temperatura ambiente, ao laboratório de Entomologia Médica do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, para a realização das análises do conteúdo intestinal. A identificação das espécies foi realizada apenas nos triatomíneos adultos de acordo com Lent & Wygodzinski (1979), observando algumas características para a espécie *T. brasiliensis*, como pronoto com carenas e frequentemente outras áreas claras e fêmures escuros com manchas centrais claras. A espécie *T. pseudomaculata* foi caracterizada por cabeça não elevada posteriormente na vista lateral. Olhos pequenos e primeiro segmento do rostro pouco mais curto que o terceiro.

3.2 MÉTODO DIRETO A FRESCO PARA PESQUISA DO CONTEÚDO INTESTINAL DOS TRIATOMÍNEOS COLETADOS

O método direto a fresco foi conduzido exatamente como seria por profissionais da Secretaria de Saúde. O conteúdo intestinal de ninfas e adultos de triatomíneos vivos e recém-mortos foi analisado para a visualização de movimentos e características morfológicas sugestivas de *Trypanosoma* spp.

O material intestinal dos insetos vivos e recém-mortos é relativamente líquido e foi obtido pela ampola retal, após compressão do abdômen. Sob uma lâmina de microscopia, uma gota de solução fisiológica foi homogeneizada a uma ou duas gotas do conteúdo intestinal e coberta com lamínula de vidro para microscopia. Todos os campos foram observados em microscópio óptico de luz branca (marca Leitz Dialux modelo 22/22 EB) em aumento de 400X (SAÚDE, 1981).

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA DO CONTEÚDO INTESTINAL DOS TRIATOMÍNEOS COLETADOS

A obtenção do conteúdo intestinal dos insetos vivos e recém-mortos foi realizada como descrito no item 3.2. O material coletado (1 a 3 gotas de conteúdo fecal dos insetos vivos e todo o intestino dos recém-mortos) foi submetido à extração de DNA por meio do kit comercial Wizard[®] Genomic (Promega, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O material extraído foi suspenso em 100 µL de solução de hidratação e acondicionado a -20 °C. Após a extração do DNA, o mesmo foi quantificado usando espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

3.4 CONTROLES POSITIVOS DE *Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma rangeli*

O DNA utilizado como controle positivo de *T. cruzi* (linhagem G) e *T. rangeli* (linhagem Choachi) foi cedido gentilmente pelo Dr. Wanderson Duarte da Rocha da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e pela Dra. Iriane Eger, do Instituto Carlos Chagas (ICC), Fiocruz/Curitiba, respectivamente. A partir de culturas axênicas dos parasitos, o DNA de *T. cruzi* foi obtido segundo método de Sambrook; Maniatis; Fritsch (1989) e o DNA de *T. rangeli* de acordo com Medina-Acosta & Cross (1993). Para o controle negativo foi utilizada água ultrapura autoclavada.

3.5 AMPLIFICAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) DE *Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma rangeli*

Para a reação da PCR foram adotadas condições previamente descritas (THEKISOE *et al.*, 2010) utilizando os iniciadores listados na TABELA 1. O tamanho do produto amplificado foi comparado com dados do *GenBank* e confirmado por meio de PCR realizada com os controles positivos. Os alvos de amplificação foram a região variável dos minicírculos do cinetoplasto e o gene 5S do rRNA de *T. cruzi* e *T. rangeli*, respectivamente.

TABELA 1 - TAMANHO DO PRODUTO AMPLIFICADO, SEQUÊNCIA E TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO (TM) DOS INICIADORES UTILIZADOS NA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma rangeli*.

| Espécie alvo | Tamanho do produto | Iniciador | Sequência do iniciador (5-3') | TM (°C) |
|-------------------|--------------------|-----------|-------------------------------|---------|
| <i>T. cruzi</i> | 330 pb | Tcru1-121 | AAATAATGTACGGGKAGATGCATGA | 62.2 |
| | | Tcru2-122 | GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA | 63 |
| <i>T. rangeli</i> | 375 pb | TrINT1 | CGCCATTTCGTTTGTCC | 59.6 |
| | | TrINT2 | TCCAGCGCCATC ACTGATC | 62.3 |

FONTE: THEKISOE *et al.* (2010).

A PCR foi primeiramente adequada para cada conjunto de iniciadores utilizando o DNA controle de *T. cruzi* e *T. rangeli*. O processo compreendeu a utilização de diferentes concentrações de MgCl₂, que foram de 1 mM; 1,5 mM; 3 mM; 4mm e 6 mM, e diferentes temperaturas de anelamento, incluindo 54 °C, 56 °C e 58 °C. Para avaliar a sensibilidade da reação, o DNA controle de *T. cruzi* foi diluído de forma seriada em concentrações que variaram de 5,5 ng a 0,5 fg. Para *T. rangeli* a concentração utilizada, obtida de diluição seriada, foi de 13,6 ng de DNA. Para avaliar a especificidade da reação, o DNA de *T. rangeli* foi utilizado nas reações para amplificação de DNA de *T. cruzi* e vice versa. O DNA alvo foi utilizado em concentrações finais que variaram de 3 ng a 80 ng (DNA extraído do conteúdo intestinal dos triatomíneos).

A mistura da reação de PCR, para um volume final de 25 µL, continha o tampão da reação, na concentração 1X (5 mM Tris-HCl [pH 9,0]; 5 mM NaCl) 0,2 pMol de cada iniciador, 6 mM de MgCl₂ para *T. cruzi* e 4 mM para *T. rangeli*, 25 µM de dNTPs e 1 U de Taq (Promega, Estados Unidos). O programa de termociclagem

compreendeu desnaturação a 94 °C por dois minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C (etapa de desnaturação), 30 segundos a 54 °C, para *T. cruzi*, e 58 °C para *T. rangeli* (etapa de anelamento) e 30 segundos a 72 °C (etapa de extensão); finalizando com 7 minutos a 72 °C (para finalizar a extensão). Todas as reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL (Biologix Research Company) em termociclador (modelo MG96+, Biocycler).

Após a amplificação, 9 µL do produto amplificado foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,8 %, em tampão tris-borato-EDTA (TBE). O marcador 1 Kb DNA *Ladder* (Invitrogen®) foi utilizado para estimar o peso molecular dos produtos. O gel foi corado em uma solução de 0,5 µg/mL de brometo de etídio, posteriormente os produtos foram visualizados por meio de transiluminador ultravioleta e fotodocumentados (Cell Biosciences, modelo FluorChem FC2 Imaging System).

3.6 AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR ALÇA (LAMP)

A sequência alvo para amplificação pela técnica LAMP foi o gene 18S do rRNA e o gene C-11 do snRNA, de *T. cruzi* e *T. rangeli*, respectivamente, descritos anteriormente (THEKISOE *et al.*, 2010). A TABELA 2 mostra os dados dos iniciadores empregados na reação de LAMP.

Assim como a PCR, a LAMP foi primeiramente adequada para cada conjunto de iniciadores utilizando o DNA controle de *T. cruzi* e *T. rangeli* conforme condições previamente sugeridas (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; KUBOKI *et al.*, 2003; NJIRU *et al.*, 2011a). No entanto, o processo de adequação envolveu ajustes nas concentrações de 1,4 mM; 2,5 mM; 2,8 mM e 25 µM de dNTPs, de 0,1 % e 0,2 % de Tween-20 e 0,2 M a 1,6 M de betaína. Os componentes da reação que apresentaram melhores resultados até o momento incluem as concentrações dos seguintes iniciadores: 5 pMol de F3 e B3, 40 pMol de FIP e BIP e 20 pMol de LF e LB, tampão 1X (20 mM Tris-HCl [pH 8,8], 10 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 10 mM [NH₄]₂SO₄), 0,1 % de Tween-20, 25 µM de dNTPs e 8 U de *Bst* DNA polimerase (New England Biolabs, Tokio, Japão), para um volume total de 25 µL. Para as reações controle e teste de sensibilidade, utilizou-se o DNA proveniente de parasitos de cultura axênica em concentrações que variaram de 9 ng, 3,8 ng, 0,38 ng e 0,038 ng

de DNA de *T. cruzi*. Para avaliar a especificidade da reação, o DNA de *T. rangeli* foi utilizado nas reações para amplificação de DNA de *T. cruzi* e vice versa.

TABELA 2 - NOME, SEQUÊNCIA E TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO (TM) DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR ALÇA (LAMP) DE *Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma rangeli*.

| Espécie alvo | Iniciador | Sequência dos iniciadores (5-3') | TM (°C) |
|-------------------|-----------|--|---------|
| <i>T. cruzi</i> | FIP | CGTGAGTTGAGGGAAGGCATGAGTTGTTGGCAGACTTCGGT | 69.2 |
| | BIP | GCATCCAGGAATGAAGGAGGGTTTCGTCTTGGTGCGGTCTA | 69.1 |
| | F3 | CCGTGTGGCACTGTTTGT | 56.2 |
| | B3 | TGAAGAATGCCTTCGCTGT | 54.6 |
| | LF | CATGTGAGATGCGAAGGG | 53.3 |
| | LB | CATGTGAGATGCGAAGGG | 53.3 |
| <i>T. rangeli</i> | FIP | TCATGCGTTCGAGCCGTACGCGAGAACGGGAGCA | 72.7 |
| | BIP | TTGCAGTTTCTGTCTCAGCCTGACGTTTCAGTGTGAGCTGAG | 68.8 |
| | F3 | TCGAGGACGGGCGAGAA | 57.4 |
| | B3 | AAAAGGGGGGAAAGCAAGT | 54.8 |
| | LF | CCCGCCTTCTTCGCTCT | 57.7 |
| | LB | GCGCGTGACGACACAAC | 57.6 |

FONTE: THEKISOE *et al.* (2010).

Para as reações utilizando DNA extraído do conteúdo intestinal dos insetos, testaram-se concentrações finais que variaram de 3 ng a 90 ng. Nestas condições, as reações também foram testadas com temperaturas de 58 °C, 60 °C, 61 °C e 62 °C, por uma e duas horas de incubação isotérmica. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose na concentração de 1,5 % para confirmação do padrão típico de amplificação em escada (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NJIRU *et al.*, 2011a). Em paralelo também foi adicionado à reação de LAMP 1 µL do corante EvaGreen (Jena Bioscience, Alemanha) na concentração de 100X para a visualização, a olho nu e/ou por transiluminador, dos produtos amplificados.

4 RESULTADOS

4.1 COLETAS DOS TRIATOMÍNEOS UTILIZADOS NO ESTUDO

Um total de 134 insetos foi coletado em diversos municípios do estado da Bahia, conforme TABELA 3.

TABELA 3 – MUNICÍPIOS, REGIÕES E NÚMERO DE TRIATOMÍNEOS COLETADOS EM CADA LOCALIDADE NO ESTADO DA BAHIA.

| Municípios | Regiões | Número de triatomíneos coletados |
|-------------------|-------------------|----------------------------------|
| Senhor do Bonfim | Povoado Itapicuru | 5 |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | 16 |
| Andorinha | Fazenda Cachoeira | 66 |
| Andorinha | Fazenda da Barra | 4 |
| Andorinha | Povoado de Poços | 3 |
| Pindobaçu | Fazenda Jatobá | 3 |
| Pindobaçu | Fazenda Garimpo | 8 |
| Pindobaçu | Fazenda Gameleira | 10 |
| Irecê | Xiquexique | 15 |
| Filadélfia | Aroeira | 4 |
| Total | | 134 |

Todos os insetos foram coletados em área peridomiciliar, em entulhos de telhas, tijolos, madeiras e troncos de árvores (FIGURA 6). Para este estudo foram utilizados um total de 51 insetos, dentre vivos e recém-mortos, sendo 3 da Fazenda Jatobá/ Pindobaçu e 2 do Povoado de Itapicuru/Senhor do Bonfim, totalizando 5 ninfas. Dos 46 adultos, 15 eram do Povoado Alto/Antônio Gonçalves, 26 da Fazenda Cachoeira/Andorinha, 1 de Poços/Andorinha e 4 da Fazenda da Barra/Andorinha. O restante dos triatomíneos que não foram utilizados neste estudo, insetos secos, foi armazenado para posterior análise.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS TRIATOMÍNEOS

Dentre os insetos adultos, 29,41 % foram identificados como *T. pseudomaculata*, 60,78 % como *T. brasiliensis* e 9,80 % eram ninfas, cuja identificação não foi possível, segundo Lent & Wygodzinski (1979) (FIGURA 7 e APÊNDICE A)



FIGURA 6 – COLETA DE TRIATOMÍNEOS EM DIFERENTES LOCAIS NOS MUNICÍPIOS DO CENTRO NORTE DO ESTADO DA BAHIA. Procura dos triatomíneos em telhas e tijolos (A) triatomíneo sobre uma telha (B) sobre entulho de madeira (C) e em tronco de árvores (D).

Ninfas não identificadas *Triatoma pseudomaculata* *Triatoma brasiliensis*



FIGURA 7 – NINFAS E AS ESPÉCIES *Triatoma pseudomaculata* E *Triatoma brasiliensis* DE TRIATOMÍNEOS COLETADAS NO CENTRO NORTE DO ESTADO DA BAHIA. FONTE: GONÇALVES *et al.* (2012) *, O autor (2012).

4.3 MÉTODO DIRETO A FRESCO PARA PESQUISA DE TRIPANOSOMATÍDEOS NO CONTEÚDO INTESTINAL DOS TRIATOMÍNEOS COLETADOS

O método direto a fresco para pesquisa de epimastigotas e tripomastigotas foi realizado nos 51 insetos (41 vivos e 10 recém-mortos). Apenas uma amostra teve resultado positivo sugestivo para *T. cruzi* (TABELA 4). De acordo com a SESAB, quando o resultado é positivo, fica registrado como positivo para *T. cruzi*, mesmo tendo conhecimento que apenas pelo padrão de movimentação e características morfológicas do parasito vivo não é possível determinar a espécie.

4.4 ADEQUAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA *Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma rangeli*

Neste trabalho a PCR foi sensível para detectar amostras contendo 0,5 fg do DNA controle de *T. cruzi* (FIGURA 8A). O nível de detecção desejado foi entre 0,33 fg e 33 fg correspondendo a 1 e 100 parasitas, respectivamente (MOSER; KIRCHHOFF; DONELSON, 1989). Para a detecção de *T. rangeli*, foram necessários no mínimo 13,6 ng do DNA controle (FIGURA 8B). Os produtos amplificados apresentaram o tamanho esperado para o jogo de iniciadores utilizados; 330 pb para *T. cruzi* e 375 pb para *T. rangeli* (FIGURA 8). A reação foi específica, uma vez que não ocorreu amplificação de DNA quando os iniciadores de *T. rangeli* foram utilizados para amplificar o DNA controle de *T. cruzi* e vice versa (dados não mostrados). Sabe-se que existem inúmeras espécies de protozoários como, por exemplo, *T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense*, *T. lewise*, *T. equiperdum*, dentre outros, mas essas espécies não transmitidas por triatomíneos, mas por outros hospedeiros. O protozoário *T. conorhini* também é transmitido por triatomíneos, no entanto não foi o objetivo do presente trabalho diagnosticá-lo. As reações foram realizadas em triplicata.

4.5 PCR DO DNA EXTRAÍDO DO CONTEÚDO INTESTINAL DOS TRIATOMÍNEOS COLETADOS

Das 51 amostras de DNA extraídas do conteúdo intestinal de triatomíneos e submetidas à reação de PCR, foi observado amplificação do DNA alvo de *T. cruzi* em 16 (31,36 %) amostras, (TABELA 4). Foi possível observar o mesmo perfil de

amplificação para todas as amostras analisadas, resultando em um produto amplificado de aproximadamente 330 pb. Algumas amostras amplificaram uma banda adicional de aproximadamente 600 pb, observada também no controle positivo para *T. cruzi* (FIGURA 9). Nenhum resultado foi positivo para *T. rangeli* pela PCR. Isso pode ser explicado pelo fato da reação não estar adequada ou porque o número de parasitas era muito baixo. Este resultado não diminui a importância do trabalho uma vez que a prioridade era detectar a positividade por *T. cruzi*. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

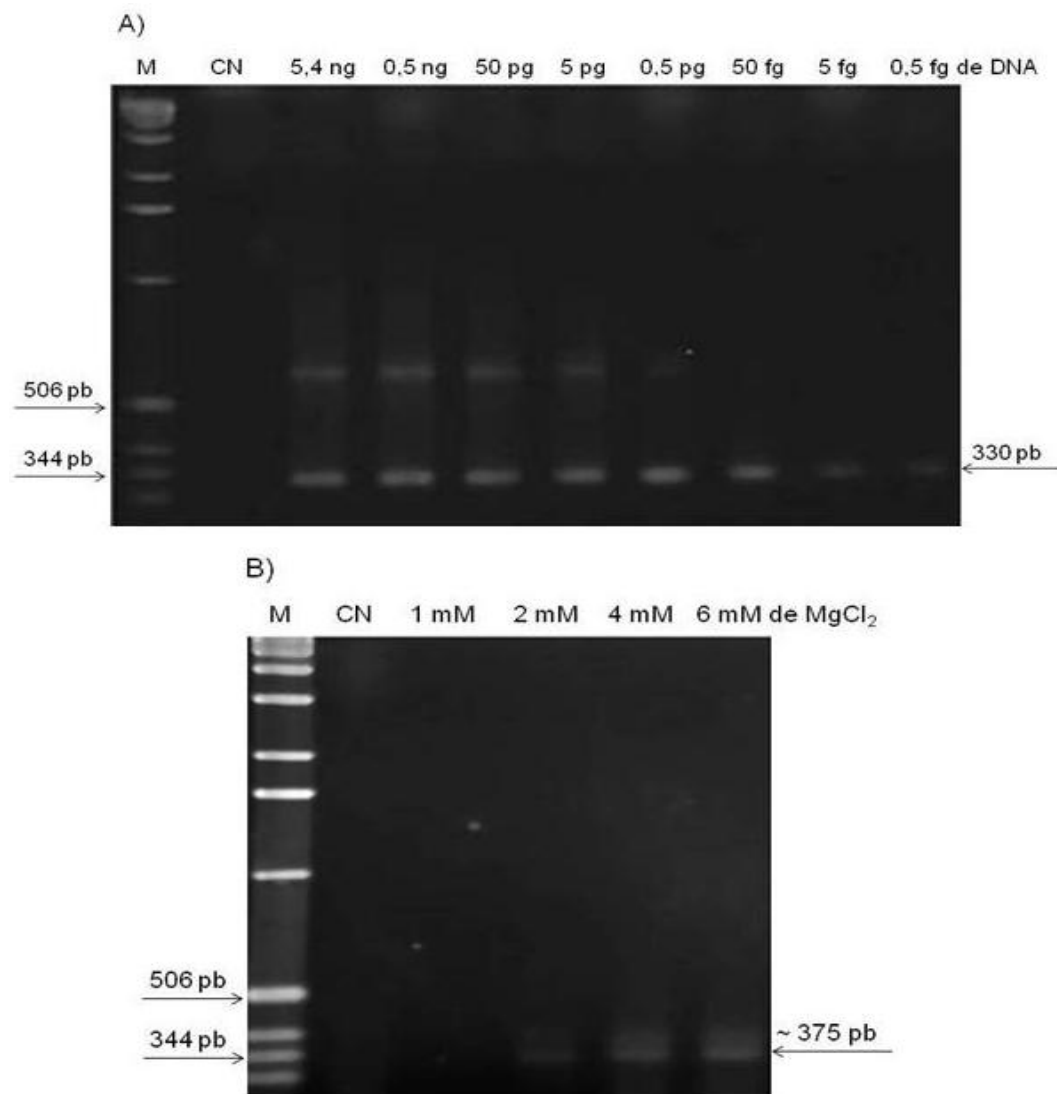


FIGURA 8 - AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Trypanosoma cruzi* (A) E *Trypanosoma rangeli* (B) POR PCR PARA CONTROLE POSITIVO. As reações de PCR com 5,4 ng a 0,5 fg de DNA de *T. cruzi* amplificaram um produto esperado de aproximadamente 330 pb, com uma banda adicional de aproximadamente 600 pb. Concentrações de 1 mM a 6 mM de MgCl₂ foram testadas para a concentração final de 13,6 ng DNA de *T. rangeli*, resultando em uma melhora na amplificação. (M) Marcador de peso molecular (INVITROGEN®). (CN) Controle negativo. Foto representativa de um gel de agarose 1,8 %, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminação ultravioleta.

Para averiguar a sensibilidade para detecção de *T. cruzi* no conteúdo intestinal dos insetos coletados, o método direto a fresco foi comparado com a técnica de PCR. Como resultado, a PCR foi mais sensível em relação ao método direto a fresco detectando 31,36 % de insetos infectados com o protozoário. No entanto, para uma mesma amostra, apenas 1,96 % foi sugestiva para *T. cruzi* pelo método direto a fresco. A maioria dos municípios investigados apresentaram triatomíneos contendo DNA de *T. cruzi*, com exceção da Fazenda Jatobá/Pindobaçu e a localidade de Poços/Andorinha.

TABELA 4 – NÚMERO E ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS COLETADOS POR MUNICÍPIO DO CENTRO NORTE DO ESTADO DA BAHIA E RESULTADOS OBTIDO PELO MÉTODO DIRETO A FRESCO E PCR PARA *Trypanosoma cruzi*

| MUNICÍPIOS | NÚMERO DE TRIATOMÍNEOS COLETADOS | MÉTODO DIRETO A FRESCO (%) | PCR (%) | ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|-------------|--------------------------------|
| Pindobaçu/Fazenda Jatobá | 3 | 0 | 0 | Ninfa sem identificação |
| Senhor do Bonfim/Povoado Itapicuru | 2 | 0 | 1 (1,96 %) | Ninfa sem identificação |
| Antônio Gonçalves/Povoado Alto | 15 | 1 (1,96 %) | 2 (3,92 %) | <i>Triatoma pseudomaculata</i> |
| Andorinha/Fazenda Cachoeira | 26 | 0 | 11(21,56 %) | <i>Triatoma brasiliensis</i> |
| Andorinha/Povoado Poços | 1 | 0 | 0 | <i>Triatoma brasiliensis</i> |
| Andorinha/Fazenda Barra | 4 | 0 | 2 (3,92 %) | <i>Triatoma brasiliensis</i> |
| Total | 51 | 1,96 % | 31,36 % | |

4.6 ADEQUAÇÃO DA TÉCNICA LAMP PARA DETECÇÃO DE DNA DE *Trypanosoma cruzi*

Os produtos provenientes da reação controle de LAMP utilizando o DNA extraído da cultura de linhagens conhecidas de *T. cruzi*, após serem separados por

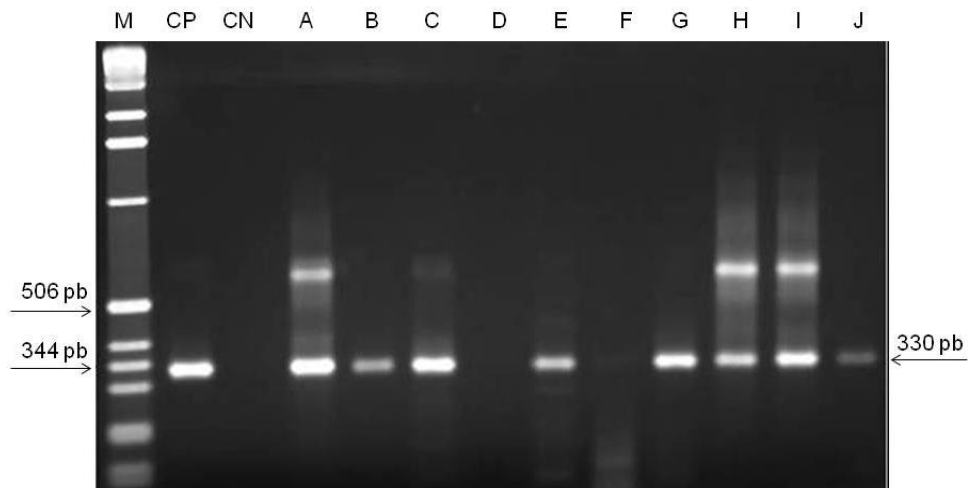


FIGURA 9 - AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Trypanosoma cruzi* POR PCR EM AMOSTRAS DO CONTEÚDO INTESTINAL DE TRIATOMÍNEOS. As amostras A, B, C, E, F, G, H, I e J apresentaram um produto de aproximadamente 330 pb, como o esperado. (M) marcador de peso molecular 1 Kb (INVITROGEN®). (CP) Controle positivo. (CN) Controle negativo. Foto representativa de um gel de agarose 1,8 %, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminação ultravioleta.

tamanho em gel de agarose a 1,5 %, mostraram um padrão característico, em escada (FIGURA 10). As temperaturas de anelamento testadas de 58 °C a 62 °C resultaram em diferenças na quantidade de produto amplificado (FIGURA 10). Incubando a reação por 1 h a mais do tempo recomendado de 1 h, não aumentou a sensibilidade da reação (FIGURA 10). A reação mostrou ser específica, uma vez que não houve amplificação do DNA de *T. cruzi* quando os iniciadores de *T. rangeli* foram utilizados e vice versa (dados não mostrados. Triplicatas ainda devem ser obtidas).

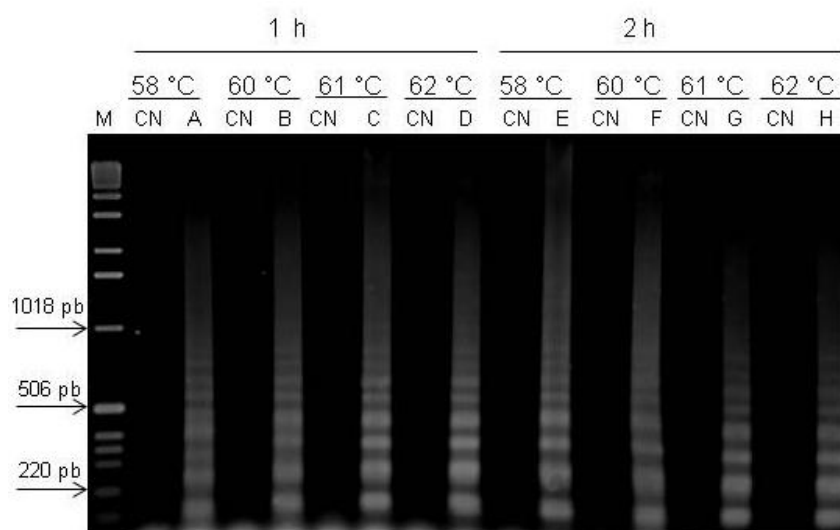


FIGURA 10 – DIFERENTES TESTES REALIZADOS PARA A TÉCNICA DE LAMP PARA OBTENÇÃO DE CONTROLE POSITIVO DE *Trypanosoma cruzi*. Foram testadas quatro temperaturas (58, 60, 61 e 62 °C) e dois tempos de incubação (1 e 2 h). (M) marcador de peso molecular 1 Kb (INVITROGEN®). (CN) controle negativo. Foto representativa de um gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio e visualizado sob transiluminação ultravioleta.

De acordo com os resultados descritos para LAMP, novas tentativas de otimizar a reação foram realizadas a partir da melhor temperatura de amplificação. Foram testados reagentes como betaína, que quando adicionada, inibiu a reação e também Tween-20 que não resultou em uma melhora significativa na amplificação. Diferentes concentrações de DNA extraído de cultura *in vitro* axênica de *T. cruzi*, de 9 ng, 3,8 ng, 0,38 ng e 0,038 ng também foram utilizadas. Tanto para a concentração de 9 ng quanto para a de 3,8 ng foi obtido o mesmo padrão de amplificação. Utilizando 0,38 ng de DNA ainda foi possível observar produtos amplificados. Neste caso, acredita-se que por meio da LAMP possa-se amplificar pelo menos 1 ng de DNA (FIGURA 11). As reações foram realizadas em triplicata.

Testes foram feitos com o corante fluorescente EVAGreen, como forma alternativa para a detecção dos produtos da LAMP, no entanto, a metodologia ainda está em processo de otimização.

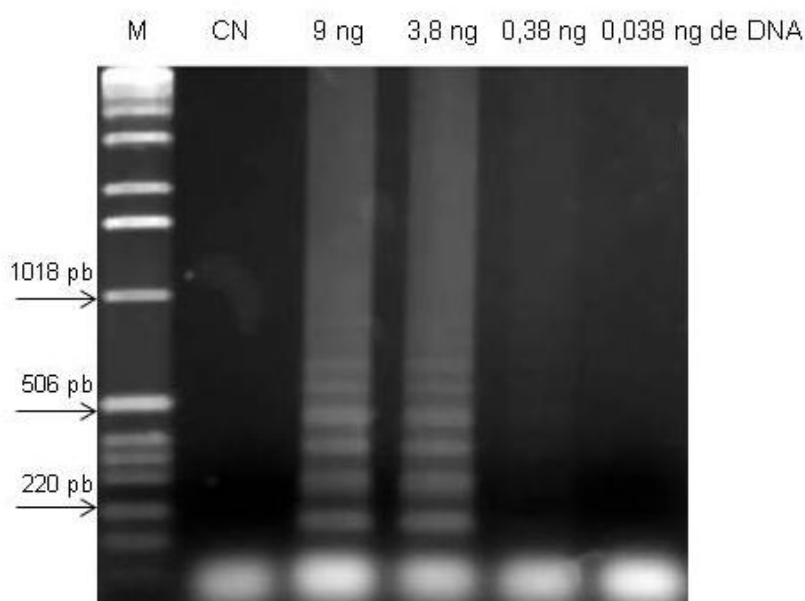


FIGURA 11 – RESULTADO DA TÉCNICA LAMP PARA OBTENÇÃO DE CONTROLE POSITIVO DE *Trypanosoma cruzi*. Diferentes concentrações de DNA (9; 3,8; 0,38 e 0,038 ng) foram utilizadas a uma temperatura de 62 °C, por 1 hora, para a amplificação. (M) marcador de peso molecular 1 Kb (INVITROGEN®). (CN) controle negativo. Foto representativa de um gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminação ultravioleta.

4.7 LAMP DO CONTEÚDO INTESTINAL DOS TRIATOMÍNEOS

Até o momento, apenas duas amostras de DNA extraído do conteúdo intestinal dos insetos coletados, confirmadas positivamente para *T. cruzi* pela técnica de PCR, foram submetidas à técnica de LAMP. No entanto, não foi possível obter

amplificação do DNA de *T. cruzi* nestes dois casos utilizando a técnica LAMP, assim. Reagentes como Triton X100 e dimetilsulfóxido (DMSO) também serão testados a fim de aperfeiçoar a reação.

5 DISCUSSÃO

Para uma vigilância epidemiológica eficaz da doença de Chagas, é necessário investigar o hábitat e a quantidade de triatomíneos, bem como ter conhecimento da prevalência de insetos infectados com *T. cruzi*. Essa informação é fundamental para determinar áreas com maior potencial de transmissão do parasito.

O encontro das espécies *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, no presente trabalho, é de elevada importância, visto que essas espécies foram encontradas em áreas peridomiciliares e podem estar em processo de domiciliação na região. A espécie *T. brasiliensis* habita pilhas de tijolos, telhas, rochas, galinheiros, além de estar associado com criações de cabras e ovelhas. A *T. pseudomaculata* geralmente está presente onde às casas estão mais próximas da vegetação, em galinheiros construídos com troncos de árvores, próximo a rebanhos de bovinos, de cabras e de ovelhas (WALTER *et al.*, 2005; SARQUIS *et al.*, 2012). A presença de triatomíneos adultos no peridomicílio pode representar um alto potencial de colonização (FREITAS *et al.*, 2004), pois o peridomicílio proporciona um ambiente oportuno com animais domésticos que servem de fonte alimentar (COSTA; LORENZO, 2009; SARQUIS *et al.*, 2012). Por se tratar de insetos coletados no peridomicílio, é importante saber se estão infectados com *T. cruzi*.

A inexistência de dados publicados sobre a prevalência de triatomíneos infectados no centro norte do estado da Bahia impossibilita fazer comparações pregressas na região estudada. É possível comparar a porcentagem de 1,96 % (1/51) de *T. pseudomaculata* adulto infectado com *T. cruzi*, do presente estudo, com outros resultados obtidos pelo mesmo método direto a fresco em outros estados. No Distrito Federal foi encontrado 1 % de triatomíneos infectados com *T. cruzi* em *P. megistus* (MAEDA; KNOX; GURGEL-GONÇALVES, 2012) e no Piauí 0,01 % em *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* (GURGEL-GONÇALVES *et al.*, 2010). No estado do Ceará, Sarquis *et al.* (2012) encontrou 2,8 % de positividade para *T. cruzi* na espécie *T. brasiliensis* e 11,6 % em *R. nasutus*. Por outro lado, Lima *et al.* (2012) encontraram porcentagens maiores de insetos infectados por *T. cruzi* no Ceará, 69 % de *T. pseudomaculata* e 25 % de *R. nasutus*. No estado de Minas Gerais, 8,3 % de *Panstrongylus megistus*, 2,9 % de *Rhodnius neglectus* e 1,4 % de *Triatoma sordida* foram encontrados infectados com *T. cruzi* (PAULA *et al.*, 2010). No período de 1996 a 2000, no estado do Paraná, um total de 1.522 exemplares das espécies

T. sordida, *P. megistus* e *R. neglectus* foram coletadas com o objetivo de fazer um levantamento da positividade para *T. cruzi*, como resultado, a espécie de maior prevalência, neste estudo, foi a *T. sordida* representada por 86,6 % seguida da espécie *P. megistus* com 13 % (FALAVIGNA-GUIHERME *et al.*, 2004). Populações de *P. megistus* também foram encontradas na cidade de Curitiba no estado Paraná (KOPP *et al.*, 2009) o que é um motivo de alerta, uma vez que no noroeste do estado do Paraná, a positividade para *T. cruzi* foi de 13,4 % em *T. sordida* e 13,5 % em *P. megistus* (GUILHERME *et al.*, 2001). No estado do Paraná, de um total de 135 insetos analisados, das espécies *T. sordida* e *P. megistus*, a positividade para *T. cruzi* foi de 43 % (TOLEDO *et al.*, 1997). Baseando-se apenas nas informações acima, percebe-se que pelo método direto a fresco, várias espécies de triatomíneos potencialmente vetoras são encontradas infectadas com *T. cruzi* em diversos estados brasileiros.

Apesar das secretarias de saúde utilizar o método direto a fresco para a observação de *T. cruzi* no conteúdo intestinal em triatomíneos, esse método não é o mais indicado para o diagnóstico. Falsos positivos podem ocorrer, uma vez que os triatomíneos podem apresentar em seu conteúdo intestinal tripanossomatídeos como *T. rangeli* cuja distribuição geográfica é sobreposta à da espécie *T. cruzi*, além de serem morfologicamente semelhantes (VALLEJO *et al.*, 1988). Outro fato a ser apontado é a carga parasitária por *T. cruzi* nos insetos, que pode estar baixa ou alta, porém com parasitos inativos. Além de todos estes fatores, o exame direto a fresco pode ser realizado inadequadamente e mesmo a amostra contendo parasitos suficientes, os mesmos podem não ser detectados. Assim, a capacitação dos profissionais da saúde, quanto à correta realização do exame é de extrema importância. Assim mesmo, no caso do exame direto, o diagnóstico positivo sempre será para *T. cruzi*, ignorando a possibilidade de ser outro tripanossomatídeo. A grande possibilidade de obter falso negativo pode estar associada ao resultado obtido no presente trabalho, visto que apenas 1,96 % dos insetos analisados apresentaram positividade sugestiva para *T. cruzi*.

Na tentativa de diminuir os resultados falsos negativos e positivos dos insetos vetores, inúmeras técnicas foram adotadas, como por exemplo, a PCR, (DIAS *et al.*, 2007b; PAVIA *et al.*, 2007; BOTERO *et al.*, 2010). No entanto, para o diagnóstico de protozoários que podem existir em quantidades pequenas na amostra, como por exemplo, *T. cruzi* em triatomíneos, a PCR deve ser adequada

para detectar uma quantidade mínima de DNA. A bibliografia aponta diversos protocolos para o melhoramento da sensibilidade da PCR, como a utilização de diferentes iniciadores para diferentes alvos e otimização da concentração de $MgCl_2$ (MOSER; KIRCHHOFF; DONELSON, 1989; DORN *et al.*, 1999; DESQUESNES; DAVILA, 2002; PAVIA *et al.*, 2007; BOTERO *et al.*, 2010). A concentração de DNA genômico recomendada para uma PCR é de 5 ng a 50 ng (SAMBROOK; MANIATIS; FRITSCH, 1989), no entanto, a concentração de DNA genômico utilizada para PCR de *T. cruzi* em alguns artigos publicados variou de acordo com os iniciadores utilizados e a linhagem analisada (DEGRAVE *et al.*, 1988; TREJO, 2006).

No presente trabalho, apenas um triatomíneo foi encontrado teoricamente positivo para *T. cruzi*, indicando que a carga parasitária destes insetos parece ser baixa. Portanto, a PCR foi adequada para detectar uma quantidade ínfima de DNA de *T. cruzi* extraído do conteúdo intestinal dos insetos. Por meio da PCR, fazendo uso de controles positivos obtidos de cultura axênica, foi possível amplificar 0,5 fg de DNA de *T. cruzi*, que corresponde a aproximadamente um parasita, de acordo com Moser; Kirchoff; Donelson (1989). Em alguns produtos de amplificação para *T. cruzi* com os iniciadores para o minicírculo do DNA do cinetoplasto, foi observado uma banda adicional no tamanho de 600 pb, que pode indicar sequências repetitivas do DNA genômico do parasito (LIARTE, 2006). Para a adequação da PCR para amplificar o DNA controle de *T. rangeli*, foram utilizadas diferentes concentrações de $MgCl_2$, de DNA e diferentes temperaturas de anelamento para os iniciadores TrINT1 e TrINT2. Assim mesmo, a amplificação ocorreu apenas com uma quantidade mínima de 13,6 ng de DNA de *T. rangeli*. O ideal seria realizar mais testes para melhorar a sensibilidade da técnica semelhante ao de *T. cruzi*. Experimentos futuros podem ser realizados caso o objetivo seja detectar a prevalência de *T. rangeli* em triatomíneos.

Após a adequação da PCR foi possível determinar que dentre as 51 amostras de conteúdo intestinal de triatomíneos, 16 (31,36 %) foram positivas para DNA de *T. cruzi*. Esse valor é alto quando comparado à única amostra (1,96 %) positiva pelo método direto a fresco, mostrando a importância de se aliar técnicas mais sensíveis ao método direto a fresco. Este resultado obtido com o método direto a fresco pode estar subestimado pelos vários fatores mencionados anteriormente. Por isso, investir em treinamentos para os profissionais que trabalham com o diagnóstico de *T. cruzi* em triatomíneos, pelo método direto a fresco, é uma opção

para diminuir resultados falsos negativos, uma vez que a capacitação desses profissionais é extremamente importante para um resultado fidedigno.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, é possível alertar as autoridades de saúde para que intensifiquem os programas de controle da doença de Chagas dos municípios de Antônio Gonçalves e Andorinha, cuja prevalência de *T. cruzi* foi de 3,92 % e 25,48 %, respectivamente. Com relação aos outros municípios estudados o número de triatomíneos coletados foi baixo e, além disso, todos eram ninfas, que possivelmente tem menos tempo de se infectar. Portanto, nesses municípios a prevalência encontrada não é acurada, mas provavelmente seja próxima à de Antônio Gonçalves e Andorinha. Desta forma, ressalta-se a importância de dar continuidade às coletas para ampliar a amostragem e com isso ratificar a prevalência de insetos infectados na região.

Dos triatomíneos coletados 29,41 % foram da espécie *T. pseudomaculata* e 60,78 % da espécie *T. brasiliensis* ressaltando a importância de reforçar a vigilância e o controle vetorial da doença de Chagas, visto que essas duas espécies já foram encontradas positivas para o *T. cruzi* na região nordeste da Bahia (SARQUIS *et al.*, 2004; GONÇALVES; FREITAS; FREITAS, 2009; SILVA *et al.*, 2012).

Apesar da PCR proporcionar um resultado sensível e específico para presença de *T. cruzi* em triatomíneos, é uma técnica dispendiosa e mais trabalhosa, dificultando a sua utilização pelos municípios do centro do estado da Bahia. Em contra partida, a LAMP aparece sendo tão eficaz quanto a PCR mais rápida e de menor custo (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; IWAMOTO; SONOBE; HAYASHI., 2003; CURTIS; RUDOLPH; OWEN, 2008). Por isso, o presente trabalho utilizou a técnica LAMP em paralelo à PCR com o objetivo de tornar a tecnologia da biologia molecular mais atraente e acessível às organizações diretamente ligadas à saúde pública. A LAMP foi adequada para amplificar amostras controles obtidas de cultura *in vitro* de *T. cruzi*. No entanto, mais ensaios devem ser realizados para detectar DNA de *T. cruzi* nas mesmas amostras de insetos coletados com resultado positivo pela PCR.

Inúmeros fatores podem ter interferido na sensibilidade da LAMP em detectar DNA de *T. cruzi* do conteúdo intestinal dos insetos. Primeiro, a metodologia empregada para a extração do DNA de *T. cruzi* do conteúdo intestinal dos insetos diferiu daquela utilizada para extração do DNA proveniente de cultura axênica. Enquanto a primeira foi realizada com um kit comercial de extração, a segunda foi

com fenol-clorofórmio. Segundo, que poderia ter influenciado é a concentração de DNA genômico de *T. cruzi* na reação. Suspeita-se que a concentração de DNA presente nas amostras analisadas dos insetos pode ter sido baixa para a sensibilidade da LAMP, uma vez que foi obtido sucesso na amplificação das amostras controle contendo concentrações mais elevadas e puras do DNA de *T. cruzi*. Trabalhos que relatam a utilização de LAMP para amplificação de DNA de várias espécies de *Trypanosoma* utilizam entre 100 ng a 1 fg de DNA proveniente de cultura ou extraído de diversas amostras (THEKISOE *et al.*, 2005; THEKISOE *et al.*, 2007; NJIRU *et al.*, 2008a; NJIRU *et al.*, 2008b; NJIRU *et al.*, 2011b). Terceiro, alguns reagentes como a betaína e Tween-20, que deveriam favorecer a amplificação por evitar a formação de dímeros e estruturas secundárias nos produtos formados (KUBOKI *et al.*, 2003; NJIRU *et al.*, 2008a; NJIRU, 2011a) no presente trabalho, não favoreceram ou até inibiram a LAMP. Desta forma, tanto a metodologia empregada para a extração de DNA bem como a concentração de DNA e os reagentes utilizados na reação LAMP podem ser críticos e serão levados em consideração em estudos futuros.

6 CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho foi possível adequar a PCR para detecção do DNA de *T. cruzi* em triatomíneos, bem como obter dados epidemiológicos importantes. Um dado epidemiológico considerável foi o fato dos insetos coletados estarem em área peridomiciliar e serem *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, espécies consideradas vetoras potenciais de *T. cruzi*. A SESAB tem conhecimento da existência dessas espécies no peridomicílio, mas acredita não estarem infectadas com *T. cruzi*, pois os resultados obtidos pelo método direto a fresco são normalmente negativos. Realmente, utilizando o mesmo método, foi constatado que dentre as 51 amostras provenientes de triatomíneos, apenas uma teve resultado sugestivo para *T. cruzi*. Por outro lado, com a adequação da PCR, foi possível determinar que 31,36 % desses mesmos triatomíneos apresentaram o DNA de *T. cruzi*. A discrepância nos resultados obtidos com o método direto a fresco e PCR foi surpreendente e serve de alerta para a SESAB de que o número de insetos infectados com *T. cruzi* pode ser muito maior. Por isso, técnicas moleculares devem ser aliadas ao método empregado, juntamente com a capacitação dos profissionais da saúde para que o método direto seja realizado de forma mais eficaz. Esses insetos infectados e animais presentes no peridomicílio contribuem para manter o ciclo biológico do protozoário. Por se tratar de uma região com instabilidade climática, como seca intensa e prolongada, a quantidade de animais que serve de fonte de alimento para os triatomíneos pode diminuir, pressionando o inseto a buscar novas alternativas alimentares dentro das residências, colocando em risco os moradores da região.

Uma parceria entre a Universidade Federal do Paraná e a SESAB se faz necessária para um efetivo trabalho epidemiológico, visto que não existem dados de prevalência de triatomíneos infectados por *T. cruzi* nesta região.

7 PERSPECTIVAS

Dentre as perspectivas, primeiramente pretende-se comunicar a SESAB dos resultados do presente trabalho, alertando da importância de se adicionar uma técnica de biologia molecular. Além disso, adequar a técnica LAMP para que ela possa ser utilizada pela SESAB como uma alternativa mais barata e rápida. Por fim, utilizar os dados preliminares obtidos no presente trabalho, em estudos futuros de prevalência e incidência das espécies de triatomíneos infectadas por *T. cruzi*. Adicionalmente, sugere-se a realização de exames sorológicos e moleculares específicos para *T. cruzi* na população e também nos animais que vivem ao entorno das residências, pois são os prováveis responsáveis pela contaminação dos triatomíneos.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELSALAM, K. *et al.* An Optimized Protocol for DNA Extraction from Wheat Seeds and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) to Detect *Fusarium graminearum* Contamination of Wheat Grain. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 6, p. 3459-72, 2011.
- BELTRAME-BOTELHO, I. T. *et al.* Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. **Infect Genet Evol**, v. 5, n. 1, p. 17-28, 2005.
- BORGES, E. C. *et al.* Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceara State, Northeastern Brazil. **Acta Trop**, v. 93, n. 1, p. 119-26, 2005.
- BOTERO, A. *et al.* Differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* of Colombia using minicircle hybridization tests. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 68, n. 3, p. 265-70, 2010.
- BRASIL, M. D. S. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Bahia/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. p. 20, 2005.
- BRASIL, M. D. S. Superintendência de vigilância em saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Informe da situação do controle da doença de Chagas, com especial referência aos avanços logrados na interrupção da transmissão vetorial por *Triatoma infestans*. Salvador: p. 63, 2006.
- CARVALHO, R. U. *et al.* **Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas**. Rio de Janeiro: Fiocruz: 1997. 393.
- COSTA, A. L. Triatomíneos e Tripanosomas por eles Veiculados em Zona Central na Cidade do Salvador - Bahia. **Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador**, p. 81, 1955.
- COSTA, J.; LORENZO, M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 46-51, 2009.
- CURTIS, K. A.; RUDOLPH, D. L.; OWEN, S. M. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **J Virol Methods**, v. 151, n. 2, p. 264-70, 2008.
- DEGRAVE, W. *et al.* Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 27, n. 1, p. 63-70, 1988.
- DESQUESNES, M.; DAVILA, A. M. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Vet Parasitol**, v. 109, n. 3-4, p. 213-31, 2002.

DIAS-LIMA, A. G.; SHERLOCK, I. A. Sylvatic vectors invading houses and the risk of emergence of cases of Chagas disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 611-3, 2000.

DIAS, F. B. *et al.* First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceara, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 643-5, 2007a.

DIAS, F. B. S. *et al.* First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 643-645, 2007b.

DIAS, J. C. *et al.* [General situation and perspectives of chagas disease in Northeastern Region, Brazil]. **Cad Saúde Pública**, v. 16 Suppl 2, p. 13-34, 2000.

DIAS, J. C. P. *et al.* o principal artífice do combate à doença de Chagas nas Américas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, p. 502-504, 2008.

DORN, P. L. *et al.* Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. **Am J Trop Med Hyg**, v. 60, n. 5, p. 740-5, 1999.

EIKEN (Eiken Chemical Co., Ltd). 2011. Disponível em <http://www.loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>>. Acesso em 15 de junho de 2011.

FALAVIGNA-GUILHERME, A. L., *et al.* Triatomine infestation and vector-borne transmission of Chagas disease in northwest and central Paraná, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v. 20, p. 1191-1200, 2004.

FERREIRA, L. F.; JANSEN, A. M.; ARAUJO, A. Chagas disease in prehistory. **An Acad Bras Cienc**, v. 83, n. 3, p. 1041-4, 2011.

FREITAS, S. P. C. *et al.* Influência de hábitos antrópicos na dispersão de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, através de *Mimosa tenuiflora* (Willdenow) (Mimosaceae) no Estado do Ceará, Brasil. **Cad Saúde Pública**, v. 20, p. 333-336, 2004.

FRIAS-LASSERRE, D. A new species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardo* Frias *et al* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. **Neotrop Entomol**, v. 39, n. 4, p. 572-83, 2010.

FU, S. *et al.* Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 163, n. 7, p. 845-50, 2011.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol Today**, v. 7, n. 9, p. 240-4, 1991.

- GARCIA, E. S. *et al.* *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. **Exp Parasitol**, v. 78, n. 3, p. 287-93, 1994.
- GARSIDE, L. H.; GIBSON, W. C. Absence of the glutamic acid/alanine-rich protein (GARP) genes in the Nannomonas species *Trypanosoma simiae* and *T. godfreyi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 74, n. 2, p. 211-5, 1995.
- GONÇALVES, M. L. C.; ARAÚJO, A.; FERREIRA, L. F. Paleoparasitologia no Brasil. **Cien Saude Colet**, v. 7, p. 191-196, 2002.
- GONÇALVES, R. G. *et al.* Guia de triatomíneos da Bahia. Feira de Santana, 2012.
- GONÇALVES, T. C. M.; FREITAS, A. L. C.; FREITAS, S. P. C. Surveillance of Chagas disease vectors in municipalities of the state of Ceará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1159-1164, 2009.
- GONZALEZ, M. S.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S. The influence of triatomine hormonal regulation on the development of *Trypanosoma cruzi*. **Atlas of Chagas' Disease Vectors in the America, Fiocruz, Rio de Janeiro**, n. In RU, p. 665-707, 1998.
- GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-42, 2003.
- GUILHERME, A.L.F. *et al.* Secondary triatomine species in dwellings and other nearby structures in municipalities under epidemiological surveillance in the state of Paraná, Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 9, p. 385, 2001.
- GURGEL-GONÇALVES, R. *et al.* Distribuição geográfica, infestação domiciliar e infecção natural de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) no Estado do Piauí, Brasil, 2008. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 1, p. 57-64, 2010.
- HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitol Res**, v. 76, n. 4, p. 311-8, 1990.
- HONG, T. C. *et al.* Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 5, p. 1956-61, 2004.
- IWAMOTO, T.; SONOBE, T.; HAYASHI, K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 6, p. 2616-22, 2003.
- KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol Today**, v. 16, n. 9, p. 381-7, 2000.
- KUBOKI, N. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 12, p. 5517-24, 2003.

LEAL, J. M.; SHERLOCK, I. A.; SERAFIM, E. [Observations on the campaign against triatomines in dwellings with BHC in Salvador, Bahia]. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v. 17, n. 1, p. 65-73, 1965.

LENT, H.; WYGODZINSKI, P. Revision of the Triatominae (HEMIPTERA, REDUVIDAE), and their significance as vectors of Chagas' Disease. **Bul I Am Mus Nat Hist**, v. 163, n. 3, p. 125-520, 1979.

LIARTE, D. B. **Desenvolvimento de uma PCR multiplex capaz de detectar e classificar cepas de *Trypanosoma cruzi* em amostras clínicas e de campo**. 2006. Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte - MG.

LIMA, M. M. *et al.* Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, p. 143-149, 2012.

MACHADO, E. M. *et al.* A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 863-6, 2000.

MAEDA, M. H.; KNOX, M. B.; GURGEL-GONCALVES, R. Occurrence of synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the Federal District of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 1, p. 71-6, 2012.

MAIA DA SILVA, F. *et al.* Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Mol Ecol**, v. 16, n. 16, p. 3361-73, 2007.

MAIA DA SILVA, F. *et al.* Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. **Acta Trop**, v. 107, n. 2, p. 168-73, 2008.

MAJIWA, P. A. *et al.* Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy-coat samples from antigenaemic but aparasitaemic cattle. **Parasitology**, v. 108 (Pt 3), p. 313-22, 1994.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. [Centenary of the discovery of Chagas disease: challenges and prospects]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 5, p. 483-5, 2010.

MARUYAMA, F. *et al.* Detection of bacteria carrying the stx2 gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 8, p. 5023-8, 2003.

MASIGA, D. K. *et al.* Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. **Int J Parasitol**, v. 22, n. 7, p. 909-18, 1992.

MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Mol Biochem Parasitol**, v. 59, p. 327-329, 1993.

MELLO, C. B. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. **J Invertebr Pathol**, v. 65, n. 3, p. 261-8, 1995.

MORI, Y. *et al.* Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 289, n. 1, p. 150-4, 2001.

MORI, Y.; HIRANO, T.; NOTOMI, T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. **BMC Biotechnol**, v. 6, n. 3, 2006.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 7, p. 1477-82, 1989.

NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Mol Cell Probes**, v. 16, n. 3, p. 223-9, 2002.

NASCIMENTO, C. *et al.* Encontro de *Panstrongylus megistus* em ecótopo artificial: domiciliação ou mera visitação? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 333-336, 1997.

NJIRU, Z. K. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 1, p. e147, 2008a.

NJIRU, Z. K. *et al.* African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 5, p. 589-99, 2008b.

NJIRU, Z. K. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification test for *Trypanosoma vivax* based on satellite repeat DNA. **Vet Parasitol**, v. 180, n. 3-4, p. 358-62, 2011a.

NJIRU, Z. K. *et al.* Detection of Group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* by loop-mediated isothermal amplification. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 4, p. 1530-6, 2011b.

NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 12, p. E63, 2000.

OHTSUKI, R. *et al.* Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. **J Appl Microbiol**, v. 104, n. 6, p. 1815-23, 2008.

PARIDA, M. *et al.* Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 6, p. 2895-903, 2005.

PAULA, M. B. C. d. *et al.* Occurrence of positivity for *Trypanosoma cruzi* in triatomine from municipalities in Southeastern Brazil, from 2002 to 2004. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, p. 9-14, 2010.

PAVIA, P. X. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone H2A/SIRE and the sno-RNA-C11 genes. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 49, n. 1, p. 23-30, 2007.

POON, L. L. *et al.* Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 427-30, 2005.

POON, L. L. *et al.* Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. **Clin Chem**, v. 52, n. 2, p. 303-6, 2006.

QU, D. *et al.* Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a diagnostic tool of *Toxoplasma gondii* in pork. **Vet Parasitol**, v. 192, n. 1-3, p. 98-103, 2013.

REBELO, J. M. M.; BARROS, V. L. L.; MENDES, W. A. [Triatominae species]. **Cad Saude Publica**, v. 14, n. 1, p. 187-92, 1998.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 4 ed., 2008.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.

SANTANA KDE, S. *et al.* Spatial distribution of triatomines (Reduviidae: Triatominae) in urban areas of the city of Salvador, Bahia, Brazil. **Geospat Health**, v. 5, n. 2, p. 199-203, 2011.

SANTOS JUNIOR, J. E.; DIOTAIUTI, L.; DIAS, J. C. First report of *Panstrongylus megistus* sylvatic focus in municipality of Bambui, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 510-3, 2011.

SARQUIS, O. *et al.* Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceara, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 263-70, 2004.

SARQUIS, O. *et al.* Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. **Parasitol Res**, v. 110, n. 4, p. 1481-5, 2012.

SAÚDE, M. D. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Manual de normas sobre organização e funcionamento de laboratórios de diagnóstico da doença de Chagas. Brasília, 1981.

- SCHOFIELD, C. J.; GALVAO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Trop**, v. 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009.
- SCHUSTER, J. P.; SCHAUB, G. A. *Trypanosoma cruzi*: skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 14, p. 1475-9, 2000.
- SEKI, M. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification method targeting the *lytA* gene for detection of *Streptococcus pneumoniae*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 4, p. 1581-6, 2005.
- SHERLOCK, I. A.; BRENER, Z.; ANDRADE, Z. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Guanabara Koogan, 1979.
- SILVA, G. R. **Doença de Chagas em Famílias de Duas Áreas Restritas da Cidade do Salvador**. 1966. Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador, 143 pp.
- SILVA, M. B. A. *et al.* Synanthropic triatomines (Hemiptera, Reduviidae) in the state of Pernambuco, Brazil: geographical distribution and natural *Trypanosoma infection* rates between 2006 and 2007. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, p. 60-65, 2012.
- SILVEIRA, A. C. [Current situation with chagas disease vector control in the Americas]. **Cad Saúde Pública**, v. 16 Suppl 2, p. 35-42, 2000.
- SILVEIRA, A. C., [Entomological survey (1975-1983)]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44 Suppl 2, p. 26-32, 2011.
- SILVEIRA, A. C. *et al.* El control de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur de America. **Organizacion Panamericana de la Salud**, 2002.
- SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. [The control of vectorial transmission]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44 Suppl 2, p. 52-63, 2011.
- STEINDEL, M. *et al.* *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 73-9, 1991.
- THEKISOE, O. M. *et al.* Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs. **Vet Parasitol**, v. 130, n. 3-4, p. 327-30, 2005.
- THEKISOE, O. M. *et al.* Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomosis. **Acta Trop**, v. 102, n. 3, p. 182-9, 2007.
- THEKISOE, O. M. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Am J Trop Med Hyg**, v. 82, n. 5, p. 855-60, 2010.

TREJO, S. M. C. Polymerase chain reaction (PCR) evaluation of three primer pairs for detection of *Trypanosomiasis cruzi* (Chagas Disease) in clinical samples. **Saint Martin's University Biology Journal**, v. 1, 2006.

TOLEDO, M. J. d. O. *et al.* Estudo sobre triatomíneos e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* no estado do Paraná, Sul do Brasil. Resultados preliminares. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 30, p. 197-203, 1997.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/ *T. rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Trop**, v. 110, n. 2-3, p. 137-47, 2009.

VALLEJO, G. A. *et al.* [Behavior of the infection and morphologic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*]. **Rev Bras Biol**, v. 48, n. 3, p. 577-87, 1988.

VILLELA, M. M. *et al.* Vigilância epidemiológica da doença de Chagas em programa descentralizado: avaliação de conhecimentos e práticas de agentes municipais em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. **Cad Saúde Pública**, v. 23, p. 2428-2438, 2007.

WALTER, A. *et al.* Risk factors for reinvasion of human dwellings by sylvatic triatomines in northern Bahia State, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v. 21, p. 974-978, 2005.

WASTLING, S. L. *et al.* LAMP for human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 11, p. e865, 2010.

WATKINS, R. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. **J Invertebr Pathol**, v. 17, n. 1, p. 59-66, 1971.

WHO (World Health Organization). 2012. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em 10 de dezembro de 2012.

YEO, M. *et al.* Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 1, p. 111-20, 2007.

YOSHIKAWA, T. *et al.* Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 3, p. 1348-52, 2004.

APÊNDICE A

Identificação das espécies de triatomíneos coletadas nos municípios do centro norte do estado da Bahia e resultado do método direto a fresco e PCR para o diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* nesses insetos.

| Municípios | Povoados | Identificação dos triatomíneos | Resultado do teste para <i>Trypanosoma cruzi</i> ² | |
|-------------------|-------------------|----------------------------------|---|-----|
| | | | Método direto a fresco | PCR |
| Pindobaçu | Fazenda Jatobá | Espécie não identificada (ninha) | - | - |
| Pindobaçu | Fazenda Jatobá | Espécie não identificada (ninha) | - | - |
| Pindobaçu | Fazenda Jatobá | Espécie não identificada (ninha) | - | - |
| Senhor do Bonfim | Povoado Itapicuru | Espécie não identificada (ninha) | - | + |
| Senhor do Bonfim | Povoado Itapicuru | Espécie não identificada (ninha) | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | + | + |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | + |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Antônio Gonçalves | Povoado Alto | <i>Triatoma pseudomaculata</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |

² O método direto a fresco foi baseado pelo qual é realizado pela SESAB, apenas pela observação de movimentação sugestiva de protozoários.

| | | | | |
|-----------|-------------------|------------------------------|---|---|
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Cachoiera | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Povoado Poços | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Barra | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Barra | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | + |
| Andorinha | Fazenda Barra | <i>Triatoma brasiliensis</i> | - | - |
| Andorinha | Fazenda Barra | <i>Triatoma brasiliensis</i> | | - |