

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciência Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

EUDES ALVES SIMÕES NETO

**DOENÇA DE CHAGAS AGUDA POR TRANSMISSÃO ORAL: MAIS DE UM
SÉCULO APÓS A DESCOBERTA DE CARLOS CHAGAS, O MANEJO CONTINUA
DESAFIADOR**

SÃO LUÍS

2025

EUDES ALVES SIMÕES NETO

**DOENÇA DE CHAGAS AGUDA POR TRANSMISSÃO ORAL: MAIS DE UM
SÉCULO APÓS A DESCOBERTA DE CARLOS CHAGAS, O MANEJO CONTINUA
DESAFIADOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo

SÃO LUÍS - MA

2025

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Simões Neto, Eudes Alves.

DOENÇA DE CHAGAS AGUDA POR TRANSMISSÃO ORAL : UM SÉCULO
APÓS A DESCOBERTA DE CARLOS CHAGAS, O MANEJO CONTINUA
DESAFIADOR / Eudes Alves Simões Neto. - 2025.
119 p.

Orientador(a): Conceição de Maria Pedrozo e Silva de
Azevedo.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2025.

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma Cruzi. 3. Doença
Transmitida Por Alimentos. 4. Reação Em Cadeia da
Polimerase. 5. Doença Negligenciada. I. de Azevedo,
Conceição de Maria Pedrozo e Silva. II. Título.

EUDES ALVES SIMÕES NETO

**DOENÇA DE CHAGAS AGUDA POR TRANSMISSÃO ORAL: UM SÉCULO APÓS
A DESCOBERTA DE CARLOS CHAGAS, O MANEJO CONTINUA DESAFIADOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo

Aprovada em _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo (Orientadora) /
Universidade Federal do Maranhão

1º examinador: Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira / Universidade Federal do
Maranhão

2ª examinadora: Profa. Dra. Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall'agnol / Universidade
Federal do Maranhão

3º examinador: Prof. Dr. Antônio Rafael da Silva / Universidade Federal do
Maranhão

4ª examinadora: Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto / Universidade CEUMA

“Poder-se-á na higiene pública, encontrar
meios eficazes de atenuação do mal?
Acreditamos que sim, se tal problema,
seguramente problema de Estado e de
humanidade, se tornar preocupação de um
estadista cientificamente bem orientado.”

Carlos Chagas, 1917

A Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Criador do Universo, pelo dom da vida e por permitir, através da inteligência humana, a compreensão de Sua ciência. A cada nova descoberta e avanço neste trabalho, amplio a minha certeza de que estamos ainda muito longe de entender a grandeza e perfeição da natureza universal.

Aos meus pais, José Ribamar Simões Neto e Vanda Maria Ferreira Simões, pelo sustento espiritual e amor, bem como por forjarem em mim o caráter necessário para o exercício dos dons que me foram concedidos. Se hoje exerço os ofícios de médico, professor e, futuramente, pesquisador, é na tentativa de honrá-los. Estarei satisfeito se ao final de minha carreira eu tiver conseguido ser um pouco do que vocês são.

À minha companheira e amiga de todas as horas, Raquel Melo Vieira Simões. Um curso de doutoramento é cheio de desafios e agruras, e você suportou todas elas simultaneamente às dificuldades da pandemia de covid-19. E ainda o fez me dando durante este mesmo período as nossas maiores bençãos: Elisa e Samuel. Eu peço a Deus que me faça merecedor da sua dedicação e amor incondicionais.

Às minhas irmãs, Luciana Ferreira Simões, Amanda Ferreira Simões e Chiara Simões de Laurenza, pelo carinho e amor. Vocês são para mim refrigério perene. Em especial à Amanda que, ainda como aluna e agora como colega de especialidade, me auxiliou na avaliação dos pacientes deste trabalho e na investigação epidemiológica. Você me fez um profissional mais capacitado e uma pessoa melhor. Amo vocês, suas pestes.

À minha orientadora, Mestre e Mandatária, Profa Dra Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo, que conseguiu transformar uma experiência de vida real em ciência útil. Obrigado pela paciência comigo ao longo deste curso, respeitando sempre as minhas limitações e estimulando o meu desenvolvimento. A sua incansável dedicação a tudo o que faz é responsável por manter muitos de nós (que a rodeiam) acreditando em um futuro melhor para o planeta.

Aos meus demais Mestres que contribuíram de forma excepcional para este momento: Profa Dra Maria Elizabeth Pereira Nobre e Profa Dra Glauce Socorro de Barros Viana, que me guiaram durante toda a faculdade de medicina na iniciação científica e me apresentaram a medicina baseada em evidência; à Profa Ms Ângela Massayo Ginbo e ao Prof José Maurício Pereira Lopes, por me salvarem dos caminhos cirúrgicos e me apresentarem uma especialidade tão estimulante e apaixonante; ao Prof Dr Antônio Rafael da Silva que, como decano de nossa especialidade, abriu o caminho na mata virgem da Infectologia do Maranhão para que todos nós pudéssemos andar por terrenos mais pavimentados; ao técnico Domingos Carvalho Sodré que, através da microscopia, me apresentou a arte das endemias e das doenças tropicais negligenciadas, o Brasil profundo, com seus flagelos e resiliência e os verdadeiros problemas de saúde que alguns brasileiros passam; ao Dr Daniel Wagner de Castro Lima Santos, pelas análises e contribuições valiosíssimas a esta tese.

Por fim, aos pacientes deste surto que permitiram a entrada em suas casas e o cuidado com a sua vida. Ainda tenho esperança de ver os governos oferecendo, através do Sistema Único de Saúde, um cuidado mais robusto e digno às suas necessidades.

SUMÁRIO

1.	<i>INTRODUÇÃO</i>	12
2.	<i>REFERENCIAL TEÓRICO</i>	15
2.1.	Histórico	15
2.2.	Epidemiologia e impacto da doença negligenciada	16
2.3.	O ciclo de vida do parasito	19
2.4.	A doença aguda	21
2.5.	A transmissão oral	25
2.6.	O diagnóstico	29
2.7.	O tratamento	33
3.	<i>OBJETIVOS</i>	36
3.1.	Geral	36
3.2.	Específicos	36
4.	<i>Produção bibliográfica</i>	37
4.1.	Artigo publicado oriundo dos dados desta tese de doutorado	37
4.2.	Outros artigos publicados no curso do doutorado	37
5.	<i>METODOLOGIA</i>	38
5.1.	Aspectos éticos	38
5.2.	Desenho do estudo	38
5.3.	Localização e área do estudo	38
5.4.	População do estudo e seguimento	39
5.5.	Critério de inclusão e não inclusão	40
5.6.	Definição de caso de doença de Chagas aguda	40
5.7.	Investigação epidemiológica	40
5.8.	Variáveis clínicas analisadas	41

5.9. Diagnóstico laboratorial.....	41
5.10. Tratamento realizado.....	41
6. RESULTADOS	43
6.1. Relato do surto e investigação epidemiológica	43
6.2. Características demográficas, clínicas e laboratoriais.....	49
7. DISCUSSÃO	52
7.1. Relato do surto e investigação epidemiológica	52
7.2. Características demográficas, clínicas e laboratoriais.....	54
7.3. Percepções clínico-epidemiológicas e proposições:	58
8. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICE A – Publicação dos dados do projeto do doutorado	76
APÊNDICE B – Demais publicações no curso do doutorado	97
APÊNDICE C – Metodologias dos testes diagnósticos e do preparo seguro de suco de bacaba	100
APÊNDICE D – Características demográficas, clínicas e laboratoriais do surto de 39 casos de doença de Chagas aguda por transmissão oral, Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil, 2018 a 2022.	12

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BNZ	benzonidazol
DALY	Disability Adjusted Life Years - anos de vida perdidos ajustados por incapacidade
DC	doença de Chagas
DCA	doença de Chagas aguda
DCC	doença de Chagas crônica
DNDi	Drugs for Neglected Tropical Disease initiative
DTN	doença tropical negligenciada
DTU	unidade discreta de tipagem
ELISA	imunoensaio enzimático
HAI	inibição da hemaglutinação
IFI	imunofluorescência indireta
IgG	imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1 β	interleucina 1-beta
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
MS	Ministério da Saúde
NFX	nifurtimox
PCR	reação em cadeia da polimerase
PIT	posto de informação de triatomíneo
SES/MA	Secretária de Estado da Saúde do Maranhão
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
TLRs	receptores Toll-Like
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
YLD	Years Lived With Disability - anos vividos com incapacidade
YLL	Years of Life Lost - anos de vida perdidos por morte prematura

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DO TRYPANOSOMA CRUZI CONSIDERADO OS SEUS ESTÁGIOS EVOLUTIVOS	20
FIGURA 2 – FATORES DE VIRULÊNCIA DO TRYPANOSOMA CRUZI NA FASE AGUDA	23
FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE CASOS DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA POR VIA DE TRANSMISSÃO, SEGUNDO O ANO DE DIAGNÓSTICO NO BRASIL, 2001 A 2022.	27
FIGURA 4 – NÚMERO DE CASOS DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA POR VIA DE TRANSMISSÃO, SEGUNDO ANO DE DIAGNÓSTICO NO BRASIL, 2001 A 2022.....	27
FIGURA 5 – NÚMERO DE CASOS DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA REGISTRADOS NO SISTEMA NACIONAL DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO E NA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO MARANHÃO, SEGUNDO ANO DE DIAGNÓSTICO NO MARANHÃO, 2001 2001 A 202219.	28
FIGURA 6 – MAPA DE LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO MUNICÍPIO DE PEDRO DO ROSÁRIO, MARANHÃO, BRASIL (BAIXADA OCIDENTAL MARANHENSE).....	39
FIGURA 7 – CRITÉRIOS DE SELEÇÃO, CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS E SEGUIMENTO DA POPULAÇÃO AFETADA PELO SURTO DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA EM PEDRO DO ROSÁRIO, MARANHÃO, BRASIL.	42
FIGURA 8 - FORMA TRIPOMASTIGOTA DE T. CRUZI (SETA) EM SANGUE PERIFÉRICO DO CASO ÍNDICE, CORADO USANDO A TÉCNICA DE GIEMSA (MICROSCOPIA ÓPTICA, AMPLIAÇÃO DE 1000x).	44
FIGURA 9 - ESTRADA DO POVOADO ANTA PARA A VILA BOA FÉ, PEDRO DO ROSÁRIO, MARANHÃO, BRASIL, 2018.	45
FIGURA 10 - CASA TÍPICA (DE TAPIA) NA VILA BOA FÉ, POVOADO ANTA, MUNICÍPIO DE PEDRO DO ROSÁRIO, MARANHÃO, BRASIL, 2018.....	46
FIGURA 11 - PALMEIRA OENOCARPUS BACABA (A) E SEU FRUTO (B).....	47
FIGURA 12 – PROCESSO DE PRODUÇÃO ARTESANAL DO SUCO DE BACABA REALIZADO NA VILA BOA FÉ, PEDRO DO ROSÁRIO, MARANHÃO, BRASIL.....	48
FIGURA 13 - FLUXOGRAMA PARA CONFIRMAR OU DESCARTAR CASOS SUSPEITOS DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA, SEGUNDO CRITÉRIO LABORATORIAL	60
FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA PROPOSTO.....	61
FIGURA 15 - PROPOSTA DE PADRONIZAÇÃO DE EXAMES E AÇÕES A SEREM REALIZADAS INVESTIGAÇÃO DE SURTOS, NA FASE AGUDA E NO SEGUIMENTO CASOS DE DCA	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIFERENÇAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA POR TRANSMISSÃO ORAL E VETORIAL.....	24
TABELA 2 – NÚMERO DE TRIATOMÍNEOS CAPTURADOS E TAXA DE INFECÇÃO NATURAL POR T. CRUZI, POR MÊS, EM VILA BOA FÉ, PEDRO DO ROSÁRIO, MARANHÃO, BRASIL, MARÇO A OUTUBRO DE 2018.....	49
TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DO SURTO DE 39 CASOS DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA POR TRANSMISSÃO ORAL, AGRUPADAS POR CATEGORIA, EM PEDRO DO ROSÁRIO, MARANHÃO, BRASIL, 2018.	49
TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E LABORATORIAIS DO SURTO DE 39 CASOS DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA POR TRANSMISSÃO ORAL, PEDRO DO ROSÁRIO, MARANHÃO, BRASIL, 2018 A 2022.....	12

RESUMO

A doença de Chagas aguda (DCA) por transmissão oral afeta principalmente indivíduos de baixa visibilidade e baixa renda em zonas tropicais e subtropicais. Mesmo após mais de 100 anos de sua descoberta, o manejo continua desafiador. Sua disseminação para áreas não endêmicas a tornou um problema de saúde global. O objetivo deste trabalho é demonstrar as dificuldades encontradas no tratamento de uma situação da vida real, através da descrição do surto e das características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. Esta tese examina um surto de 39 casos de DCA devido à transmissão oral pela ingestão de suco de bacaba que ocorreu em Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil. Uma investigação clínica e epidemiológica, incluindo busca entomológica, foi conduzida. Os critérios de inclusão foram: todos os casos expostos ao suco de bacaba com confirmação de DCA. Os critérios de confirmação foram gota espessa positiva, e/ou soroconversão de IgG e/ou um aumento de duas vezes no título de IgG (critérios laboratoriais); achados clínicos e exposição epidemiológica e pelo menos um teste de IgG positivo (critérios clínico-epidemiológicos). Foi realizada em 33 amostras reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. As medianas foram: idade de 32 anos, sem diferença de gênero; período de incubação de 13,8 dias; tempo entre o início dos sintomas e o tratamento de 16,6 dias. Os sintomas mais comuns foram febre e linfadenopatia (90%). Os pacientes tiveram critérios laboratoriais em 66,6% dos casos, critérios clínico-epidemiológico em 23% e 10,2% tiveram exames parasitológicos e sorológicos negativos, entretanto, foram tratados devido a alta suspeição. As taxas de positividade dos testes foram de 69,7% (23/33) para gota espessa, 91,4% (32/35) para sorologia e 100% (33/33) para PCR, incluindo os casos com parasitologia e sorologia negativas. Todos os pacientes foram tratados com benzonidazol. Não houve morte. Após 4,5 anos, os níveis de IgG foram reavaliados em 26 indivíduos. A negatificação sorológica foi alcançada em 30,7% (8/26) dos casos, e os títulos de IgG diminuíram em 7,6% (2/26). Encontramos várias barreiras, incluindo vulnerabilidade populacional, dependência de técnicas de diagnóstico rudimentares, falta de métodos padronizados de biologia molecular e opções terapêuticas limitadas. Este relatório ressalta a importância da vigilância rápida e do tratamento precoce para prevenir fatalidades. Recomendamos a inclusão da PCR na rotina diagnóstica da DCA e a padronização da investigação e acompanhamento de surtos.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, doença transmitida por alimentos, reação em cadeia da polimerase, surtos de doenças, doença negligenciada

ABSTRACT

Acute Chagas disease (ACD) by oral transmission mainly affects low-visibility and low-income individuals in tropical and subtropical areas. Even more than 100 years after its discovery, management remains challenging. Its spread to non-endemic areas has made it a global health problem. The objective of this work is to demonstrate the difficulties encountered in treating a real-life situation, through the description of the outbreak and the epidemiological, clinical and laboratory characteristics. This thesis examines an outbreak of 39 cases of ACD due to oral transmission through ingestion of bacaba juice that occurred in Pedro do Rosário, Maranhão, Brazil. A clinical and epidemiological investigation, including entomological search, was conducted. The inclusion criteria: all cases exposed to bacaba juice with confirmed ACD. Confirmation criteria were positive Giemsa stain and/or IgG seroconversion and/or a two-fold increase in IgG titer (laboratory criteria); clinical findings and epidemiological exposure and at least one positive IgG test (clinical-epidemiological criteria). Conventional polymerase chain reaction (PCR) was performed on 33 samples. The means were: age 32 years, with no gender difference; incubation period 13.8 days; time between the onset of symptoms and treatment was 16.6 days. The most common symptoms were fever and lymphadenopathy (90%). Patients had laboratory criteria in 66.6% of cases, clinical-epidemiological criteria in 23% and 10.2% had negative parasitological and serological tests, however, they were treated due to high suspicion. Test positivity rates were 69.7% (23/33) for Giemsa stain, 91.4% for serology and 100% (33/33) for PCR (including cases with negative parasitology and serology). All patients were treated with benznidazole. There was no death. After 4.5 years, IgG levels were reassessed in 26 individuals. Serological negativity was achieved in 30.7% (8/26) of cases, and IgG titers decreased by 7.6% (2/26). We encountered several barriers, including population vulnerability, dependence on rudimentary diagnostic techniques, lack of standardized molecular biology methods, and limited therapeutic options. This report highlights the importance of rapid surveillance and early treatment to prevent fatalities. We recommend the inclusion of PCR in the ACD diagnostic routine and the standardization of outbreak investigation and monitoring.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, food-borne disease, polymerase chain reaction, disease outbreaks, neglected disease

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose sistêmica causada pelo *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), um parasita intracelular hemoflagelado descoberto em 1909 (LIDANI et al., 2019) (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A tripanossomíase americana é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 20 doenças tropicais negligenciadas (DTNs) e afeta indivíduos e populações de baixa visibilidade e baixa renda em países em desenvolvimento, principalmente em zonas tropicais e subtropicais (MALECELA; DUCKER, 2021). Entretanto, apesar de ter sido negligenciada por laboratórios, empresas farmacêuticas e governos, o título de DTN também significa que é possível estabelecer seu controle ou erradicação através da aplicação de estratégias de saúde pública (HOTEZ et al., 2007).

Mesmo 115 anos após a menina Berenice e a publicação da obra de Carlos Chagas (CHAGAS, 1909), na qual ele descreve o agente etiológico, o vetor, o ciclo de vida, as manifestações clínicas e complicações da doença, além de alguns reservatórios domésticos e silvestres, a DC continua endêmica nos países da América Latina, especialmente no Brasil, Argentina, México, Bolívia e Chile (LIDANI et al., 2019) (MALECELA; DUCKER, 2021). Embora a taxa de prevalência por 100.000 habitantes tenha diminuído em muitos países entre 1990 e 2019, no Brasil foi observado um aumento de 12,8% no número estimado de casos no mesmo período (GÓMEZ-OCHOA et al., 2022). Quando avaliamos os anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALYs), notamos que o Brasil teve melhora neste indicador, entretanto, permanece ainda com grande impacto para a sociedade, uma vez que o Brasil continua a ser o país com o maior número estimado de casos e de óbitos pela doença (GÓMEZ-OCHOA et al., 2022) (MARTINS-MELO; CASTRO; WERNECK, 2021).

Nas últimas décadas, a melhoria dos programas de controle de vetores e o rastreio obrigatório das transfusões de sangue diminuíram o peso desta doença na América Latina (MALECELA; DUCKER, 2021). No entanto, embora a via de transmissão vetorial típica tenha sido controlada, as outras formas de aquisição da doença representaram um desafio nos últimos 20 anos, especialmente a vertical, oral

e pós-transplante. A transmissão por via alimentar ganhou grande importância, pois pode causar surtos secundários à contaminação de alimentos (FRANCO-PAREDES et al., 2020). O vetor mais frequentemente associado a esta via é o *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Triatominae), e a transmissão ocorre quando triatomíneos inteiros ou suas fezes carregando tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* contaminam sucos de cana-de-açúcar, bacaba, açaí ou vinho de palma. A transmissão através da ingestão de carnes de animais silvestres infectados também é descrita (FRANCO-PAREDES et al., 2020; LIDANI et al., 2019; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Atualmente, a infecção oral pelo *T. cruzi* é a via de transmissão mais importante no Brasil. Vários surtos foram documentados, especialmente na região amazônica (estados do Pará e Amazonas), e em alguns estados das regiões nordeste e sul. Além disso, a tendência ao longo dos anos é de aumento de casos (BRASIL, 2021). Essa transmissão oral representa um grande desafio para a implementação da resolução criada pelo 49º Conselho Diretor da OPAS em 2009, que promove a eliminação ou redução das doenças negligenciadas e outras doenças relacionadas à pobreza, incluindo a doença de Chagas, em todas as suas formas de apresentação (WHO; PAHO, 2009).

Em relação ao diagnóstico, ainda há grandes desafios pela frente. Algumas ferramentas padronizadas por diretrizes internacionais são difíceis de usar, requerem várias amostras, e muitas delas são arcaicas. Para a doença de Chagas crônica (DCC), continua a ser recomendada a utilização de dois testes sorológicos diferentes (ensaio imunoenzimático - ELISA, inibição da hemaglutinação - HAI, quimioluminescência - CMIA, ou imunofluorescência indireta - IFI). Em contextos de recursos limitados ou em zonas de difícil acesso, pode ser considerado um único teste ELISA, mas é necessária a confirmação com outro teste antes de iniciar o tratamento (PAHO, 2019). Nos últimos anos, alguns estudos apresentaram resultados encorajadores relativamente ao desempenho dos testes rápidos (imunocromatográficos) para o diagnóstico da DCC (EGÜEZ et al., 2017; RIVERO et al., 2024). No entanto, para a doença de Chagas aguda (DCA), continuamos a depender da microscopia (com sensibilidade variável) e dos testes imunológicos

convencionais, ambos exigindo várias amostras. Até o momento, apenas um kit de teste molecular foi aprovado para uso no Brasil, o Kit NAT Chagas, desenvolvido pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em parceria com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) (MOREIRA et al., 2023b). Seu uso ainda está longe de ser universal e essas técnicas estão restritas a laboratórios de vigilância e centros de pesquisa (CANDIA-PUMA et al., 2022). Também não existe atualmente um teste point-of-care para o diagnóstico da DCA.

As opções de tratamento da doença de Chagas são ainda mais restritas. Os dois tripanocidas disponíveis, o benzonidazol (BNZ) e o nifurtimox (NFX), são utilizados há mais de 50 anos. No entanto, devido ao tratamento prolongado (60 a 90 dias) e à alta frequência de efeitos colaterais (cerca de 40%), há uma alta taxa de abandono (LASCANO; GARCÍA BOURNISSEN; ALTCHÉH, 2022; MOLINA et al., 2015). Algumas iniciativas nesse campo merecem destaque, como do Drugs for Neglected Disease (DNDi), que ajudou a desenvolver a primeira formulação do BNZ para a pediatria, além de promover estudos com doses mais baixas e menor tempo de tratamento (CAFFERATA et al., 2020; GONZÁLEZ et al., 2023). Entretanto, muitas outras ações são necessárias para que se alcance o objetivo maior: uma medicação altamente eficaz, com baixo custo, menor tempo de tratamento e menos efeitos colaterais.

O presente estudo avalia as características clínico-epidemiológicas e os aspectos diagnósticos de um surto autóctone de DCA por transmissão oral ocorrido no município de Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil, até então não considerado como área de alta prevalência ou de alto risco de transmissão da doença. Descrevemos a vigilância epidemiológica e os métodos de diagnóstico, incluindo ferramentas moleculares. Demonstramos ainda as dificuldades encontradas para o manejo em uma situação de vida real. Esses dados nos permitiram entender melhor os riscos associados à transmissão, bem como os desafios diagnósticos e terapêuticos na atualidade. Este trabalho resultou em publicação em periódico de alto impacto (SIMÕES-NETO et al., 2024), disponível em material suplementar (Apêndice A).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Histórico

A doença de Chagas (DC) é uma antroponose sistêmica crônica causada pelo *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), um parasita intracelular hemoflagelado descoberto em 1909 por um cientista brasileiro. O trabalho de Carlos Chagas deve ser sempre lembrado, pois até o presente momento foi o único pesquisador a descrever a doença, as manifestações clínicas, as complicações, várias formas de transmissão, o agente etiológico, os reservatórios e o ciclo evolutivo (CHAGAS, 1909). Foi duas vezes indicado ao prêmio Nobel, em 1913 e 1921, mas não venceu, o que gera até hoje grandes críticas por isso (BESTETTI; CARDINALLI-NETO, 2013; BESTETTI; MARTINS; CARDINALLI-NETO, 2009; LEWINSON, 2003).

A Trypanosomatidae é uma família diversa de protozoários flagelados que pertence à ordem Tripanosomatida e classe Kinetoplastida. Dentro dela dois gêneros se destacam pelo seu impacto na saúde humana, *Trypanosoma* e *Leishmania*, causando doenças como a Leishmaniose (com mais de 20 espécies causadoras), a Tripanossomíase Africana (*T. brucei*) e a Tripanossomíase Americana (*T. cruzi*) (KAUFER et al., 2017). Segundo estudos de filogenética, é possível que um ancestral comum deste grupo de parasitos tenha se originado ainda no período Cretáceo e divergido entre si após a separação da América do Sul e África, há mais de 100 milhões de anos (ARAÚJO et al., 2009).

A DC versa entre os humanos há milhares de anos. Um estudo analisou 284 múmias andinas do período pré-Colombiano, no Chile e Peru, e encontrou DNA do cinetoplasto do *T. cruzi* em mais de 40% delas. Algumas datavam de 9.000 anos atrás, período em que os povos andinos começaram a domesticar pequenos roedores para consumo e rituais (AUFDERHEIDE et al., 2004). No Brasil os registros mais antigos são de 7.000 anos atrás, quando pesquisadores encontraram DNA do *T. cruzi* em grupos de humanos em sítios arqueológicos no estado de Minas Gerais (ARAÚJO et al., 2009).

A proximidade ambiental entre o homem e alguns animais atraiu insetos hematófagos para dentro das residências, especialmente os triatomíneos, vetores da DC. A partir daí um dos vetores, o *Triatoma infestans*, evoluiu, se diferenciando para habitar as casas de barro e madeira (“taipa”), se alimentando de sangue humano, e passando a ser quase que exclusivamente domiciliado (ARAÚJO et al., 2009). Ele costuma alimentar-se quando os humanos dormem e o seu repasto é rápido, podendo durar até 40 minutos. Como a face costuma ser a região mais descoberta durante o sono, a maior frequência de picadas se dá nesta região, por isso, ganhou o nome popular de “barbeiro”, mas também pode ser chamado de “chupão” ou “chupança” (LENT, 1999; NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009).

Um relato bastante curioso é a experiência de Charles Darwin em sua viagem pela América do Sul de 1826 a 1836. No livro “The Voyage of the Beagle”, ele descreve sua experiência na vila de Luxan, Argentina, onde afirma que foi atacado por um inseto chamado “Benchuca”, um Reduviidae, que apelidou de “o grande inseto preto dos Pampas”. O termo depois foi identificado como a forma antiga de “Vinchuca”, o *T. infestans* (DARWIN, 1839).

Alguns trabalhos foram mais além e teorizaram sobre a possibilidade de Darwin ter adquirido a DC durante a viagem. A partir de 1841 (aos 32 anos) ele passa a sentir palpitações, fadiga, tremores, flatulência e vômitos, sem causa definida pelos médicos. Evoluiu posteriormente com angina e insuficiência cardíaca, até vir a óbito aos 73 anos de infarto agudo do miocárdio (ADLER, 1959; CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020). Apesar desta teoria carecer de confirmação é, no mínimo, curioso que o pai da teoria evolutiva tenha sido vítima de um inseto e um parasito que evoluíram para sobreviver.

2.2. Epidemiologia e impacto da doença negligenciada

Estima-se que aproximadamente 6 a 7 milhões de indivíduos estejam infectadas pelo *T. cruzi* no mundo, sendo quase a totalidade na América Latina, e aproximadamente 75 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a doença. Além disso, por ano são cerca de 30 mil novos casos e 12 mil mortes relacionadas. A mais

preocupante estimativa é que mais de 70% das pessoas com DC não sabem que estão infectadas (WHO, 2024b).

Um estudo de meta análise realizado no período de 1980 a 2012 estimou que entre 1,9 e 4,6 milhões (IC 95% 2,9 a 7,2 milhões) de pessoas estivessem infectadas pelo *T. cruzi* no Brasil ao longo deste período, correspondente à variação de 1,0 a 2,4% da população (MARTINS-MELO et al., 2014). Levando em consideração que cerca de 30% desenvolvem cardiopatia chagásica, podemos inferir que pelo menos meio milhão de pessoas sofrem desta complicação no Brasil (RAMOS NASCIMENTO et al., 2024). Entretanto, o verdadeiro impacto desta doença é difícil de calcular, e deve levar em consideração incidência, prevalência, complicações, internações, perda de força de trabalho e impactos psicossociais. Uma das formas de estimar consiste na análise dos “anos de vida perdidos ajustados por incapacidade” (sigla em inglês DALY) que une os conceitos de “anos de vida perdidos por morte prematura” (sigla em inglês YLL) e “anos vividos com incapacidade” (sigla em inglês YLD). Um DALY significa um ano de vida saudável perdido (GOLD; STEVENSON; FRYBACK, 2002), que acaba sendo uma forma interessante de analisar doenças negligenciadas.

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo diverso de patologias causadas pelos mais variados agentes, como vírus, parasitas, bactérias, fungos e toxinas. Mais de 1 bilhão de pessoas são afetadas pelas DTNs e cerca de 1,6 bilhão requerem intervenção, seja preventiva ou curativa (BRASIL, 2024b; WHO, 2024a). O primeiro relatório da OMS descreve as sete características comuns entre as mais de 20 doenças: correlação com a pobreza; afetam populações com baixa visibilidade e pouca voz política; não se disseminam amplamente; provocam estigma e discriminação; tem impacto importante sobre morbidade e mortalidade; são relativamente negligenciadas pelas pesquisas; e podem ser controladas, evitadas e possivelmente eliminadas. Mais ainda, afirma que “O traço comum mais profundo é a sua prevalência asfixiante sobre populações devastadas pela pobreza” (WHO, 2012).

Quando a instituição Médicos Sem Fronteiras (MSF) venceu o prêmio Nobel da Paz em 1999, em reconhecimento ao trabalho humanitário pioneiro da organização em vários continentes, e utilizou parte do valor recebido para estruturar o Fundo para Doenças Negligenciadas, várias ações internacionais foram sendo montadas. Em

2003, a MSF, a OMS e mais outras organizações fundaram a Iniciativa para Medicamentos para Doenças Negligenciadas (sigla em inglês DNDi). A partir daí, alguns objetivos mundiais foram traçados e pactos foram feitos. A OMS estabelece desde 2012 o “roteiro para doenças tropicais negligenciadas”, onde traça as metas e caminhos para o controle, eliminação e erradicação das DTNs para a próxima década (WHO, 2012). Este documento foi atualizado em 2020, sendo as principais metas para 2030: diminuição em 90% do número de pessoas que necessitam de intervenções por causa dessas enfermidades; redução em 75% dos DALYs; eliminação de pelo menos uma doença em 100 países; e erradicação de duas doenças (WHO, 2020). Até o ano de 2023 houve redução de 26% no número de pessoas que necessitam de intervenção, redução de 11% dos DALYs, 50 países conseguiram eliminar pelo menos uma DTN e nenhuma doença foi eliminada (WHO, 2024a).

A DC compõe este seletivo grupo de doenças, possui metas bem estabelecidas, entretanto, nenhuma contempla a transmissão oral. São elas: interrupção de 04 formas de transmissão (vetorial, transfusional, transplante de órgãos e congênita); e verificação da interrupção de transmissão das 04 formas citadas (WHO, 2020).

Segundo boletim epidemiológico do MS publicado em janeiro de 2024, dentre as 9 doenças negligenciadas analisadas, a DC tem a maior mortalidade, sendo 420% maior que as outras 8 juntas (esquistossomose, hanseníase, leishmanioses, acidente ofídico, filariose, tracoma, raiva e oncocercose) (BRASIL, 2024b). Quando avaliamos os DALYs, o boletim não traz dados deste período. Um estudo comparou os anos de 1990 e 2019 em 10 países da América Latina e identificou uma redução de 32% dos DALYs neste período no Brasil, muito provavelmente secundário ao sucesso do controle vetorial que ocorreu no início dos anos 2000. Apesar da melhoria, em 2019 o Brasil teve um DALY relacionado a DC de 174.194, sendo o maior entre os países. Quando analisado proporcionalmente à população (por 100.000 habitantes), o Brasil teve o 3º maior DALY do final da série histórica, atrás apenas da Bolívia e Venezuela (GÓMEZ-OCHOA et al., 2022).

Quando se trata da carga da DC especificamente por transmissão oral, não há dados publicados. Em 2006, a OMS criou o Grupo de Referência Epidemiológica sobre a Carga de Doenças Transmitidas por Alimentos (sigla em inglês FERG), mas

em 2015 excluiu a DC por falta de recurso e por considerar que a transmissão vetorial englobaria a transmissão oral (ROBERTSON et al., 2024). Seguramente isto é um equívoco, pois quando se calculam os indicadores para DC, leva-se em consideração os valores relacionados à transmissão puramente vetorial (picada seguido da coçadura). Esta forma resulta em cerca de 30% de sintomáticos na fase aguda (sintomas leves) com 1% de mortalidade. Já na transmissão oral, quase 100% dos pacientes apresentam sintomas e a mortalidade pode ultrapassar os 30% (BRUNETO et al., 2021; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). Por isso, deve ser considerada separadamente e incluída na lista de doenças transmitidas por alimentos de preocupação mundial.

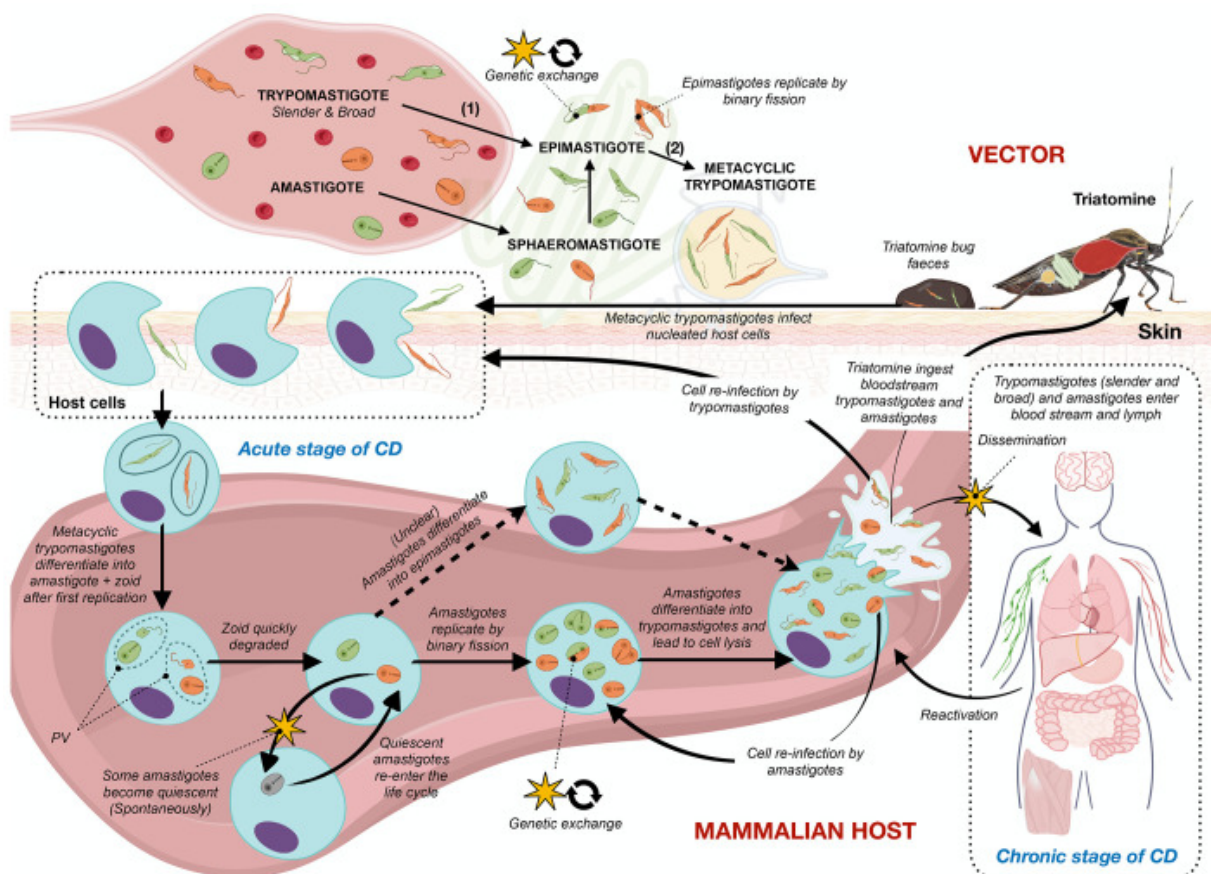
2.3. O ciclo de vida do parasito

O *T. cruzi* é um protozoário heteroxeno que reúne características bem vantajosas para sua sobrevivência. Adaptado a múltiplos habitats e hospedeiros, podem sobreviver em artrópodes, roedores, aves, marsupiais e primatas (NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009; PAHO, 2019). O ciclo de vida clássico considera a existência de apenas 04 formas: tripomastigota metacíclico (MT), tripomastigota sanguíneo (TS), amastigota (AT) e epimastigota (ET). As duas primeiras seriam as formas infectantes (no ser humano) e as duas últimas as não-infectantes (no animal e no artrópode, respectivamente). Entretanto, devido às descobertas acumuladas nos últimos 20 anos, algumas mudanças precisaram ser feitas neste conhecimento.

Logo após a picada do hematozoário, tanto o TS quanto o AT chegam ao intestino proximal do vetor. A partir daí, migram para o intestino médio e se diferenciam em ET (o AT possui ainda um estágio intermediário chamado de esferomastigota). O ET se multiplica por divisão binária e realiza extensa troca genética garantindo variabilidade, atinge o intestino distal e se diferencia em MT e este é excretado pelas fezes do triatomíneo. Esta forma invade o ser humano através das mucosas (ingestão de alimentos contaminados) ou de quebra da barreira da pele pela coçadura (transmissão vetorial clássica). A forma infectante adere às células nucleadas e são fagocitadas em um vacúolo parasitóforo, se multiplica e rompe a membrana celular atingindo a corrente sanguínea ou infectando células vizinhas. Diferencia-se, então, em amastigota, multiplica-se intensamente no citoplasma (realizando novamente

intensa troca genética), pode entrar em quiescência (estado de dormência ou latência) ou diferenciar-se em tripomastigota novamente. A partir daí ocorre a lise celular e infecção de células adjacentes, linfonodos e disseminação pela corrente sanguínea. O hematozoário suga o sangue com os TS ou AT e reinicia o ciclo (BERN, 2015; LEWIS; KELLY, 2016; MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022). Uma revisão sistemática resume o ciclo de vida atual considerando esses avanços (Figura 1) (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022)

Figura 1 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* considerado os seus estágios evolutivos



Legenda: (1) Os tripomastigotas migram para o intestino médio e se diferenciam em epimastigotas. (2) Os epimastigotas migram para o intestino distal e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Abreviaturas: DC, doença de Chagas; PV, vacúolo parasitóforo. As cores verde e laranja dos parasitas representam duas cepas diferentes e os estágios em que ocorre a troca genética. REF: figura retirada de (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022), disponível em <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.2c00123>.

A disseminação ocorre para todos os órgãos, mas especialmente para o baço, fígado, células musculares lisas, cardíacas, sistema nervoso central e periférico (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022). O parasita parece ter tropismo mais intenso pelas fibras musculares e pelo sistema nervoso autônomo, o que pode explicar o porquê o coração e os plexos mioentéricos serem os mais afetados pela doença crônica (BONNEY et al., 2019).

2.4. A doença aguda

O período de incubação é diferente para as diversas vias de transmissão. Varia de 4-15 dias para via vetorial, 30-100 dias para transfusional e de 3-22 dias para oral (BRASIL, 2018; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

A fisiopatologia da doença crônica já é bem estudada e envolve três processos fundamentais: lesão tecidual direta pelo parasita; lesão secundária por inflamação local e sistêmica; e fibrose tecidual (FERREIRA et al., 2015). Cerca de 20 a 30% das pessoas que se infectam com o *T. cruzi* acabam evoluindo para doença crônica (ECHAVARRÍA et al., 2021).

Em se tratando de doença de Chagas aguda (DCA), muitas lacunas ainda precisam ser preenchidas. As agressões teciduais desta fase geralmente são decorrentes de lesão direta do parasita, que dispara intensa resposta inflamatória imune (BONNEY et al., 2019). Esta resposta inflamatória produz redução da carga parasitária sem, no entanto, eliminar completamente o parasito. A persistência do agressor gera estimulação antigênica constante, promovendo agressão tecidual de origem imunológica (HIDRON et al., 2010). Pesquisas demonstraram alguns mecanismos possíveis, como inibição da ativação de linfócitos B e T, mimetismo de proteínas de superfície e alteração da resposta dependente de complemento (DE BONA et al., 2018). Além disso, alguns teorizam que haja produção de citocinas específicas (como a IL-10) inibindo a maturação das células apresentadoras de antígenos, promovendo um desequilíbrio na resposta adaptativa (ORTEGA ZAMORA et al., 2017). No entanto, até o momento, apenas alguns poucos trabalhos foram realmente elucidativos acerca do que ocorre nesta fase.

Sabe-se que há uma variabilidade muito grande em intensidade de sintomas e gravidade da doença aguda, com letalidade variando entre 1% e mais de 30% entre os surtos relatados (BRUNETO et al., 2021). Isso se deve muito provavelmente devido a fatores de virulência inerentes ao parasito ou à suscetibilidade do hospedeiro. Desde a primeira descrição de Carlos Chagas, ele já considerava a necessidade de avaliação dos fatores que podem influenciar essa variabilidade. A seguir a descrição literal retirada do trabalho de 1909:

“A virulencia do *Schizotrypanum cruzi* é influenciada por diversos fatores, cuja natureza e cujos efeitos não conhecemos ainda, de modo exato.

Passajens sucessivas do parazito, através de animais sensiveis atenuam, sem duvida, a virulencia delle; por outro lado, o parazito, atenuado, readquire a virulencia inicial, quando inoculado em outra especie animal. As infeções produzidas nas cobaias por picadas de conorrinos são, de regra, mais graves que as produzidas por inoculações de sangue contaminado. As primeiras matam o animal em espaço de tempo variável, comumente de 5 a 10 dias, ao passo que as últimas permitem a sobre-vida até de 2 mezes. (...)

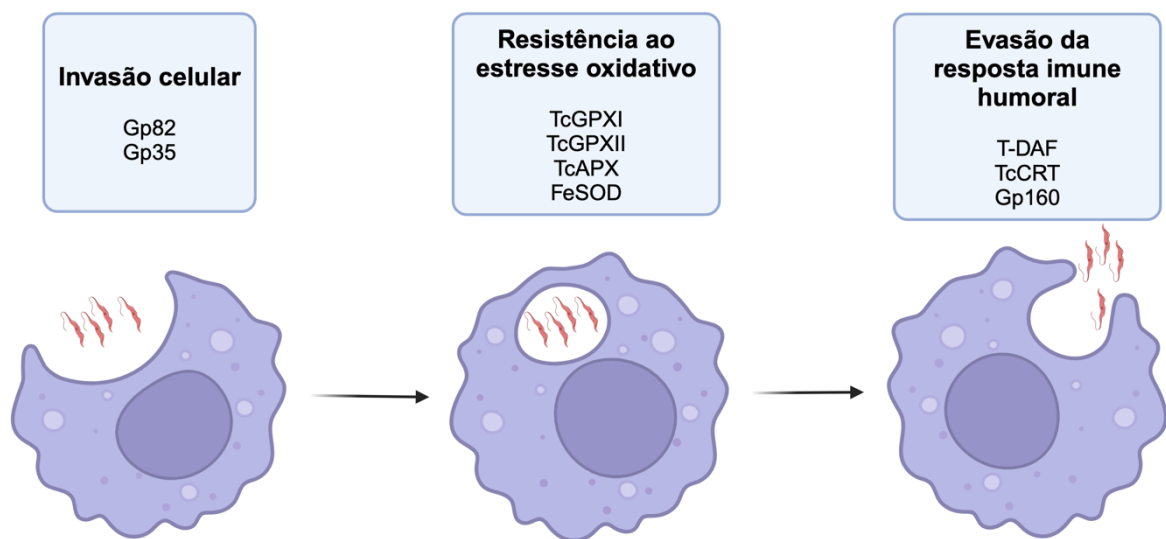
(...) Influe, ainda na intensidade da parazitoze, a via de introdução do flagelado, parecendo, de nossas experiencias, serem as inoculações intra-peritoneais as que produzem infeções maiores e mais rapidamente mortais.” (CHAGAS, 1909)

Somente nas últimas décadas começaram a ser publicados os trabalhos que avaliaram melhor as possibilidades para essa virulência. Alguns trabalhos experimentais demonstraram que certas linhagens de *T. cruzi* possuem maior letalidade, e este fator estaria associado a uma maior capacidade de replicação no sistema reticuloendotelial (CELENTANO et al., 1995; CELENTANO; GONZÁLEZ CAPPA, 1993). Outro estudo experimental, que utilizou dois clones de uma mesma linhagem oriunda de infecção em humano, demonstrou que um dos clones produzia

maior parasitemia, maior invasão tecidual e maior letalidade (POSTAN et al., 1984). Um estudo experimental em ratos conseguiu demonstrar que as linhagens mais virulentas geraram maior parasitemia, miocardite mais severa e maior mortalidade associada. Além disso, os corações dos animais tiveram uma menor expressão de receptores Toll-Like (TLRs), levando a uma menor produção de IL-12 e maior produção de IL-1 β e TNF- α , tanto no sangue quanto no coração, o que pode ter contribuído para maior gravidade (QUEIROGA et al., 2021).

Uma revisão sistemática fundamenta que existem três mecanismos principais responsáveis pela virulência e persistência do parasito: invasão celular, resistência ao estresse oxidativo e evasão da resposta imune humoral (DE CASTRO NETO; DA SILVEIRA; MORTARA, 2021). A Figura 2 demonstra este mecanismo.

Figura 2 – Fatores de virulência do *Trypanosoma cruzi* na fase aguda



Após a penetração do parasito no tecido, o tripomastigota metacíclico expressa proteínas que são responsáveis pela ativação da fagocitose, garantindo assim a primeira linha de resistência; em seguida proteínas antioxidativas passam a ser produzidas em maior quantidade, contrapondo os mecanismos intracelulares de , garantindo a segunda linha de resistência; por fim, o parasito rompe a membrana celular para atingir a corrente sanguínea ou invadir novas células e, para isso, expressa uma série de glicoproteínas de membrana que atuam na inibição das diferentes vias do complemento, garantindo a terceira linha de resistência.

Legenda: Gp82, Gp35, Gp160: glicoproteínas da superfamília da transialidase; TcGPXI, TcGPXII: glutational peroxidases; TcAPX: ascorbato peroxidase; FeSOD: ferro superóxido dismutase; T-DAF: fator acelerador de decaimento; TcCRT: calreticulina.

Adaptado de: (DE CASTRO NETO; DA SILVEIRA; MORTARA, 2021)

Criado em BioRender. Simões, E. (2024) <https://BioRender.com/o03s775>

Do ponto de vista clínico, a doença aguda se manifesta com febre prolongada (mais de 07 dias), mialgia, cefaleia, linfadenopatia generalizada, esplenomegalia, edema facial e sintomas relacionados a miocardite (tosse, dispneia, dor torácica) (BERN, 2015; CHAGAS, 1909). Esta última é a principal complicação da fase aguda e causa de quase todos os óbitos relatados (BRUNETO et al., 2021; FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017). Entretanto, a DCA pode se apresentar de forma oligossintomática ou até assintomática (FERREIRA et al., 2015), o que dificulta a suspeição clínica.

As alterações laboratoriais mais encontradas são anemia, discreta leucocitose às custas de linfocitose, com neutropenia relativa, além de alteração nas transaminases. A radiografia simples de tórax pode demonstrar aumento da área cardíaca e sinais de efusão pericárdica. Já o eletrocardiograma pode apresentar-se com taquicardia sinusal, QRS de baixa voltagem e bloqueio atrioventricular de primeiro grau (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016). Alguns pacientes também experimentam icterícia e hemorragias, o que, em cenários epidemiológicos de intercepção de endemias, pode dificultar ainda mais o diagnóstico.

A frequência de sintomáticos na fase aguda pode variar de acordo com a forma de transmissão: enquanto na vetorial varia entre 1 e 30%, na oral mais de 80% podem apresentar sintomas (BERN, 2015; BERN; MARTIN; GILMAN, 2011; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). O fator que parece preponderar nesta variação é a carga parasitária. A quantidade de *T. cruzi* presente em uma evacuação de triatomíneo varia entre 4.000 e 10.000 parasitas, enquanto no intestino inteiro pode conter até 600.000 parasitas (FRANCO-PAREDES et al., 2020; WALDECK; SCHAUB, 2022). A Tabela 1 demonstra as diferenças básicas entre a transmissão oral e a vetorial.

Tabela 1 - Diferenças clínico-epidemiológicas da doença de Chagas aguda por transmissão oral e vetorial

	Oral	Vetorial
Padrão da doença	Geralmente em surto de casos, com mesmo vínculo alimentício e com sintomas em tempos semelhantes	Embora possa haver mais de um caso por vez, não é habitual, e os casos possuem sintomatologia em tempos distintos

Padrão febril	Doença febril aguda com padrão vespertino, com duração maior que 07 dias	Menor incidência de febre, raramente com duração maior que 7 dias.
Manifestações faciais	Edema bipalpebral Edema facial	Chagoma de inoculação Sinal de Romaña
Manifestações cardíacas	Ocorrência precoce de miocardite aguda com manifestações graves	Menor frequência de miocardite aguda, mais presente em crianças
Carga parasitária	Um triatomíneo completo esmagado em alimentos ou bebidas pode conter mais de 600.000 tripomastigotas	A matéria fecal de um triatomíneo contém cerca de 10.000 tripomastigotas
Mortalidade	Entre 8–35%	Entre 1–10%

Modificado de (FRANCO-PAREDES et al., 2020)

2.5. A transmissão oral

A via de transmissão mais conhecida e classicamente descrita é a vetorial. Entretanto, sabe-se que a DC pode ser adquirida por via transfusional, transplante de órgãos, congênita (vertical), acidental (laboratório) e por via oral (pela ingestão de alimentos contaminados com o parasito) (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019).

Vários vetores já foram identificados como transmissores do *T. cruzi*. Os gêneros mais comuns são *Triatoma sp*, *Rhodnius sp* e *Panstrongylus sp*. Dentre esses, o *T. infestans* é considerado o principal vetor no Brasil. Não coincidentemente, é o mais eficaz e mais domiciliado deles, vivendo principalmente em casas feitas de barro (“taipa”) (PEREIRA et al., 2006). Por conta disso, o foco das campanhas de prevenção foi na eliminação deste vetor. Em 2006 o Brasil recebeu da Organização Panamericana de Saúde o Certificado de Eliminação do *T. infestans*. Este fato promoveu uma mudança no perfil epidemiológico da doença (DIAS, 2007).

A partir da não existência de vetores eficazes em transmitir a doença aos humanos colonizando o domicílio, a infestação peridomiciliar ganhou importância e se tornou um desafio no controle de triatomíneos. Neste sentido, a transmissão oral tornou-se predominante. Segundo o II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016) de 2000-2013, esta via foi responsável por 68,9% dos casos. O boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (MS) demonstrou que continua a tendência a aumento nesta frequência (BRASIL, 2021).

A maioria deles estão relacionados a surtos por ingestão de bebidas contaminadas, como açaí (*Euterpe oleacea*), juçara (*E. edulis*), caldo de cana (*Saccharum sp*), bacaba (*Oenocarpus bacaba*), entre outros, ou carnes de animais infectados. Ao longo do tempo, nota-se importante aumento de casos publicados na literatura. O primeiro surto registrado no Brasil se deu em 1965 com 18 casos e 6 óbitos por miocardite aguda (DA SILVA et al., 1968). Após isso, 93 casos agudos em oito surtos ocorreram entre 1965 e 2000. Em contraste, entre 2000 e 2010, mais de 250 casos agudos foram relatados em 17 surtos, principalmente na Amazônia brasileira. Entre 2010 e 2020, mais de 750 casos foram publicados em 12 surtos. Destes casos, mais de 70% foram atribuídos à ingestão de alimentos e bebidas contaminados (BRUNETO et al., 2021).

Segundo dados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (BRASIL, 2024c), de 2001 a 2006, foram notificados um total de pouco mais de 2.250 casos de DCA, nenhum deles registrados como transmissão oral, com 732 ignorados ou em branco (32%). A partir de 2007 começa-se a registrar casos de transmissão oral. Logo no primeiro ano foram 158 casos totais, com 93 por transmissão oral (58%) e 60 ignorados ou em branco (37%). Até 2010 foram 634 casos, sendo 406 por transmissão oral (64%) e 162 ignorados ou em branco (25%). Para surpresa, entre 2010 e 2020 foram notificados 2.652 casos, sendo 2.089 por transmissão oral (78%) e 35 ignorados ou em branco (1,3%). As Figuras 3 e 4 demonstram um aumento relativo e absoluto, progressivo e sustentado dos casos de DCA por transmissão oral no Brasil.

Figura 3 – Distribuição percentual de casos de doença de Chagas aguda por via de transmissão, segundo o ano de diagnóstico no Brasil, 2001 a 2022.

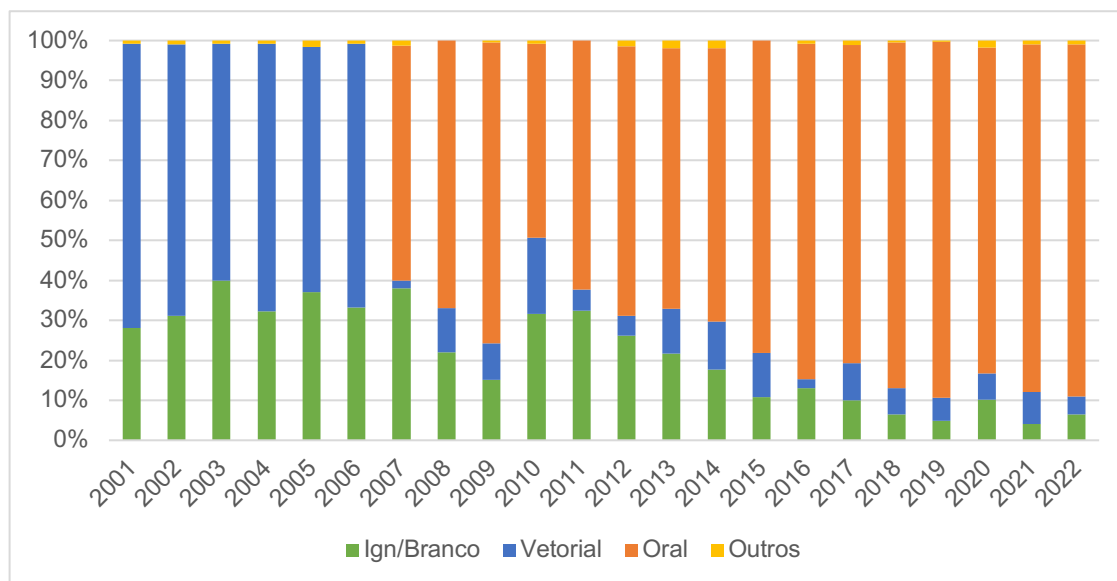
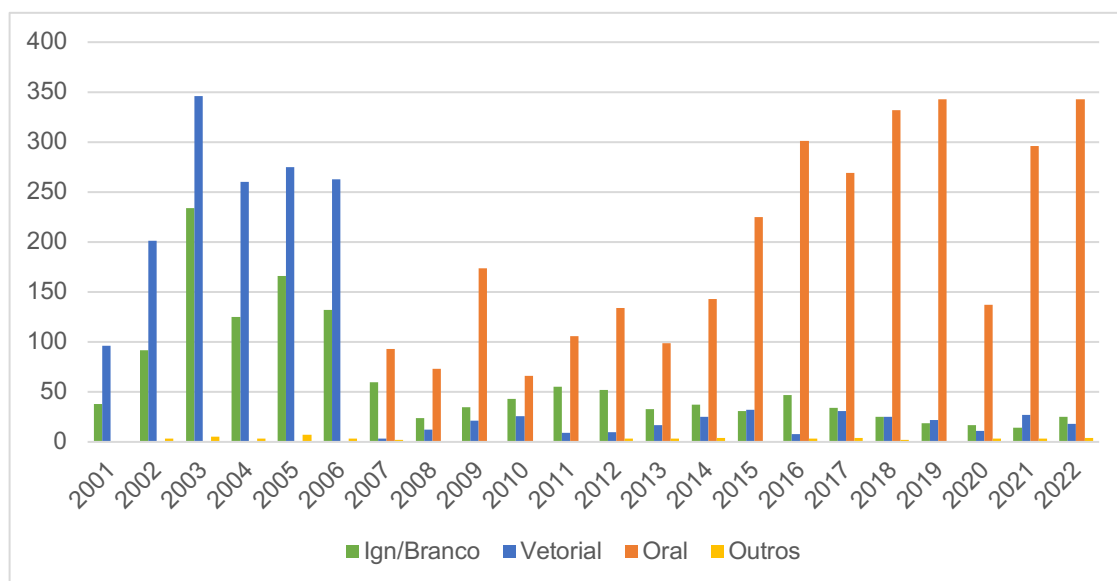


Figura 4 – Número de casos de doença de Chagas aguda por via de transmissão, segundo ano de diagnóstico no Brasil, 2001 a 2022.

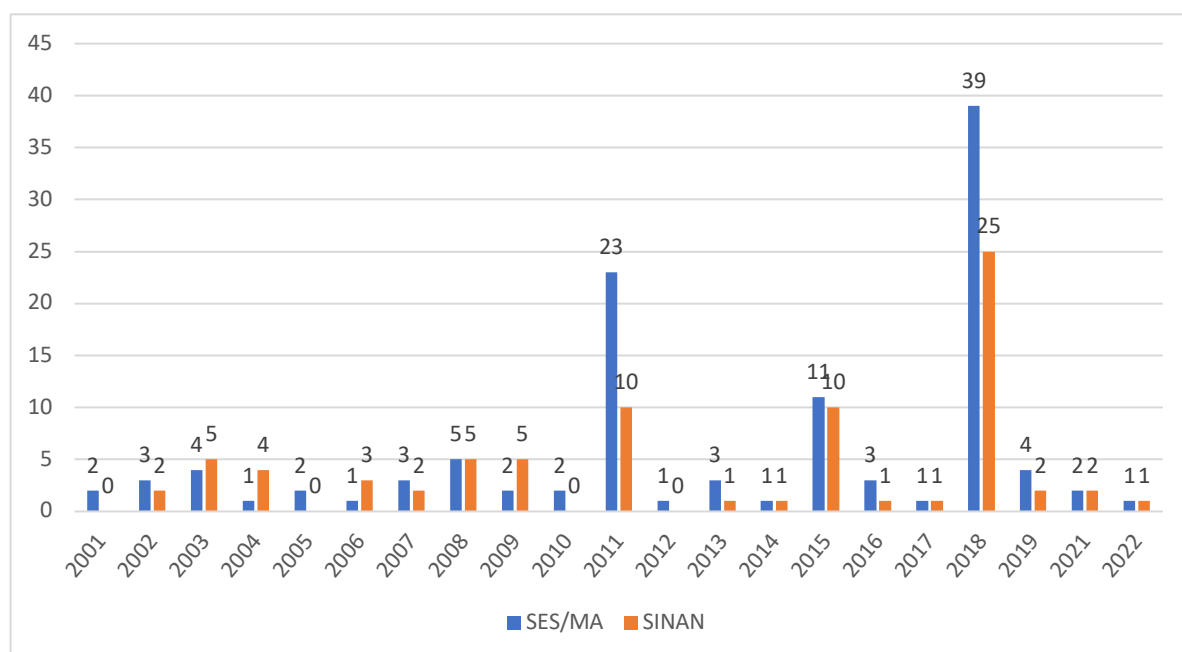


Segundo dados não publicados da Secretaria de Estado de Saúde (SES/MA), no Maranhão os primeiros casos autóctones de DCA foram diagnosticados em 1975, sendo 3 casos na ilha de São Luís e 01 no município de Cajapió (SILVA et al., 1985). A partir daí, houve um intervalo de “silêncio epidemiológico” de quase 20 anos, voltando a notificar casos isolados e anualmente a partir de 1994. Em 2011 houve um aumento importante, com 23 casos, sendo 09 de um único surto na cidade de Pinheiro.

Em 2015 novamente um novo aumento. Com 11 casos, todos de um único surto em Turilândia. Até então, este era o maior surto da região Nordeste, quando, em 2018, o Maranhão registra no município de Pedro do Rosário um surto de 39 casos por transmissão oral por consumo de bacaba. Excetuando-se os ocorridos no estado do Pará, este passa ser o maior surto do país, e vira objeto de estudo desta tese de doutorado.

No ano subsequente (2019), no município de Pinheiro, cidade vizinha, foram diagnosticados 04 casos novos também por transmissão oral. Estranhamente, entre 2020 e 2022, apenas 3 casos de DCA foram notificados no Maranhão. Como a tendência é de aumento em todas as regiões o país (BRASIL, 2021), é seguro afirmar que se trata de subnotificação. Os dados do estado são diferentes dos registrados no MS. Em boletim epidemiológico de 2015 (BRASIL, 2015), o MS indicou que, no período de 2000 a 2013, o Maranhão teve 24 casos de DCA, enquanto os dados da SES/MA demonstram que somente no ano de 2011 foram 23 casos. Na última década analisada houve subnotificação de pelo menos 55%, conforme demonstrado na Figura 5.

Figura 5 – Número de casos de doença de Chagas aguda registrados no Sistema Nacional de Agravos de Notificação e na Secretaria de Estado da Saúde do Maranhão, segundo ano de diagnóstico no Maranhão, 2001 a 2022.



São aventadas algumas possibilidades para o aumento do número de casos de DCA: a redução da transmissão vetorial predispondo maior vigilância aos outros modos de transmissão; o aumento da percepção de risco pelos profissionais de saúde com a popularização do consumo de bebidas classicamente envolvidas na transmissão; os sintomas clínicos mais intensos advindos desta via de transmissão levando as pessoas afetadas a procurarem mais o serviço de saúde.

Este novo perfil epidemiológico traz grandes preocupações, principalmente relacionado a mortalidade da doença. Isso acontece porque na transmissão oral há maior carga parasitária, além de maior facilidade do parasito em penetrar a mucosa gastrointestinal (DIAS et al., 2008; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). Esses dois fatores acarretam clínica mais exuberante e, conseqüentemente, maior letalidade descrita em vários surtos (BRUNETO et al., 2021; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). Em algumas casuístas a letalidade em um surto pode chegar a mais de 30% (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017).

2.6. O diagnóstico

Em geral, quando se trata de doenças infecciosas, os métodos de identificação do microorganismo são preferíveis. Na DC, existem métodos diretos e indiretos. Xenodiagnóstico e hemocultura estão entre os métodos indiretos. O primeiro é um procedimento antigo, mas sofisticado. Foi o método pioneiro utilizado e consiste em vetores criados em laboratório induzidos a picar pacientes e, 30 a 60 dias depois, suas fezes são analisadas em busca do parasita. Existem claramente algumas desvantagens nesta técnica, como o tempo e os recursos necessários para realizar o procedimento, bem como os riscos associados ao manuseio de insetos vetores. O segundo é outro método indireto, em que o exame deve ser realizado mensalmente por até seis meses. Entretanto, tanto o xenodiagnóstico quanto a hemocultura têm baixa sensibilidade na fase aguda (em torno de 20%) (DE CASTRO et al., 2006; SCHIJMAN et al., 2021) e são mais indicados para a fase crônica da doença (BRASIL, 2024a; PAHO, 2019).

Os métodos diretos disponíveis são a pesquisa a fresco, os métodos de concentração (Strout, micro-hematócrito e creme leucocitário) e lâmina corada de gota

espessa ou de esfregaço (BRASIL, 2024a; PAHO, 2019). A sensibilidade destes métodos é bastante variável. Enquanto há relatos de positividade de 35% (VALENTE et al., 2009a), há também publicações com valores acima de 80% (DE BARROS MOREIRA BELTRÃO et al., 2009; SANTANA et al., 2019a), sendo os valores mais altos quando realizados em laboratórios de referência, demonstrando ser examinador dependente. Dentre os três, o mais sensível é a pesquisa a fresco. Devido à variabilidade na sensibilidade, recomenda-se que o teste parasitológico seja repetido a cada 12-24 horas enquanto o quadro clínico persistir até que o parasita seja encontrado ou outro diagnóstico seja estabelecido (BRASIL, 2024a; DE SOUSA et al., 2024; PAHO, 2019).

Além do exame direto, a sorologia é uma ferramenta valiosa no auxílio diagnóstico, através da dosagem de imunoglobulinas “M” (IgM) e “G” (IgG). Para a primeira recomenda-se o método de IFI. Para a segunda utiliza-se sempre dois métodos distintos simultaneamente: ELISA, HAI, CMIA ou IFI. Recomenda-se ainda a coleta sequencial de duas amostras com intervalo mínimo de 15 dias. Considera-se positivo para DCA quando há: detecção de IgM; e/ou soroconversão de IgG; e/ou aumento dos títulos de IgG em 2 ou mais vezes nas amostras sequenciais (BRASIL, 2018; PAHO, 2019).

Os testes sorológicos são considerados os exames com melhor rendimento. A sensibilidade e especificidade são altas e semelhantes em quase todos os estudos, estando sempre próxima de 100% (NOYA et al., 2012; SANTANA et al., 2019a; VALENTE et al., 2009a). Entretanto, a IgG possui alguns inconvenientes: necessidade de duas metodologias distintas; coleta de amostras sequenciais com intervalo pré-definido; recursos laboratoriais mais complexos; e o intervalo de tempo para o resultado definitivo muitas vezes ser maior que o período de sintomas (DE SOUSA et al., 2024; SUÁREZ et al., 2022). Já a IgM possui limitações maiores: não há kits comerciais; controles positivos são difíceis de encontrar; pode permanecer positivo por anos em pacientes crônicos; e pode apresentar falso positivo com fator reumatoide e outras infecções parasitárias, como leishmaniose (SUÁREZ et al., 2022).

A imunocromatografia tem se mostrado uma boa ferramenta diagnóstica para doença crônica. Um ensaio randomizado e duplo cego realizado na Bolívia avaliou o

rendimento de dois testes rápidos comparados à sorologia convencional. Ambos tiveram sensibilidade de 100% e especificidade de 99,3% (EGÜEZ et al., 2017). Um outro ensaio não randomizado realizado na Argentina avaliou o rendimento de quatro testes rápidos e encontrou resultado semelhante em dois deles, entretanto, rendimento mais baixo em outros dois (RIVERO et al., 2024).

As vantagens destes testes consistem no fato de não necessitarem de estrutura laboratorial ou rede de frios, a sua portabilidade, o resultado rápido e o baixo custo. Uma revisão de literatura sugere incluir como critério diagnóstico de DCC dois testes rápidos positivos isoladamente (GABALDÓN-FIGUEIRA et al., 2023). Entretanto, devido a alguns trabalhos demonstrarem resultados discordantes entre as diversas marcas existentes no mercado (RIVERO et al., 2024), em 2023 um painel de especialistas envolvendo profissionais da OPAS e da FIOCRUZ recomendou que os testes rápidos não devem ser utilizados para diagnóstico de DCA ou em banco de sangue. Recomendaram ainda uso cauteloso na DCC e restrito às seguintes situações: triagem, inquéritos sorológicos e situações de grande limitação de recursos (PEREZ et al., 2024).

Com o avanço da biologia molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se revelado muito útil. Alguns trabalhos demonstram sensibilidade de 97% e especificidade de 100% (MELO et al., 2015), apesar de haver diferenças a depender da metodologia aplicada (SEIRINGER et al., 2017). Uma coorte retrospectiva com 279 doadores de sangue não tratados para DC demonstrou correlação entre baixos títulos de anticorpo, PCR negativo e menor frequência de alterações eletrocardiográficas (BUSS et al., 2020). Em contraponto, uma coorte prospectiva acompanhou 102 pacientes tratados com BNZ e demonstrou que a cinética da PCR é flutuante, enquanto a titulação de anticorpos segue uma cinética mais linear (MOREIRA et al., 2023a). Por isso, a sorologia convencional acaba sendo o indicador mais confiável de cura e o último exame a negativar (DE LANA; MARTINS-FILHO, 2015). Em uma meta-análise recente (PASCUAL-VÁZQUEZ et al., 2023), na qual vários métodos de biologia molecular foram comparados, pesquisadores demonstraram que ainda não é possível determinar o protocolo molecular mais eficaz devido à heterogeneidade dos estudos.

A escassez de kits comerciais para uso de rotina também é fator preocupante. Até o momento, apenas um kit foi aprovado para uso no Brasil, o NAT-Chagas (MOREIRA et al., 2023b). Apesar de sua utilização ainda está longe de ser universal, desde meados de 2023 o Projeto Cuida Chagas, liderado pelo Instituto Nacional de Infectologia (INI-FIOCRUZ), tem difundido e capacitado os laboratórios de referência na realização deste teste, o que pode representar um grande avanço para o futuro do diagnóstico da DCA e abre a possibilidade de traçarmos o perfil genotípico do parasito. Por ainda não ter um padrão estabelecido, a PCR tem sido reservada para os casos de avaliação de efetividade do tratamento, diagnóstico de fase crônica, pesquisa de reativação em imunossuprimidos e transmissão materno-fetal (BRASIL, 2018).

A genotipagem é uma ferramenta poderosa para investigar surtos por transmissão oral de DC. O *T. cruzi* é dividido em pelo menos seis linhagens, classificadas em unidades discretas de tipagem (DTU), de TcI a TcVI. Há ainda a possibilidade da existência de uma sétima linhagem, a Tcbat, entretanto, ainda não há consenso se esta não seria apenas uma sublinhagem da TcVI (LIMA et al., 2015; ZINGALES et al., 2012; ZINGALES; MACEDO, 2023). Uma revisão sistemática de 2022 demonstrou que todas as DTU são amplamente distribuídas na América Latina e que, no Brasil, a maioria das publicações está associada à TcI, seguido pela TcII. Entretanto, todas as linhagens já foram descritas em nosso território (VELÁSQUEZ-ORTIZ et al., 2022). Dentre as linhagens mais descritas que promovem infecções em humanos estão a TcI e TcIV (ZINGALES, 2018), mas há relato de caso de transmissão oral em que foram encontradas 04 formas distintas em coração de um paciente que veio a óbito no estado do Espírito Santo, Brasil (DARIO et al., 2016).

O acompanhamento em longo prazo de pacientes com DC deve ser realizado anualmente para avaliação clínica, realização de exames cardiológicos, laboratoriais e avaliação de critérios de cura. Em relação a isso, algumas observações devem ser feitas. Não existem biomarcadores que definam cura da DCC. Sorologias não convencionais direcionadas a formas específicas de *Trypanosoma* foram testadas com resultados inconclusivos ou conflitantes, como anti-tripomastigota vivo (FC-ALTA) (MARTINS-FILHO et al., 2002), anti-epimastigota fixo (FC-AFEA) (WENDLING et al., 2011), IgG1 anti-formas evolutivas (epimastigota, tripomastigota e amastigota:

FC-ATE-Triplex) (ALESSIO et al., 2014). Testes de antígeno também foram avaliados, entretanto, o seu melhor uso seria na antecipação da cura, já que negativaram antes da sorologia convencional (FABBRO et al., 2013; RIVERO et al., 2023). Na DCA recomenda-se a realização de sorologia convencional (IgG) anualmente, durante cinco anos e é considerado curado aquele com dois exames sucessivos negativos (BRASIL, 2024a).

2.7. O tratamento

Apenas duas drogas são aprovadas para o tratamento da doença de Chagas, benzonidazol (BNZ) e nifurtimox (NFX), ambas descobertas há mais de 50 anos. Apenas a primeira está disponível (BRASIL, 2018, 2024a). O BNZ é feito na dose de 5-10mg/kg/dia, com limite de 300mg/dia e a duração é de 60 dias. Importante frisar que o tratamento possui alta frequência de efeitos colaterais, sendo os mais importantes: dermatite alérgica (20-30%) e neuropatia periférica (5-10%). O NFX deve ser feito na dose de 10-15mg/kg/dia e a duração também é de 60 a 90 dias, possuindo como efeitos colaterais mais importantes intolerância gastrointestinal (60%), artralgia (30%) e dermatite alérgica (15%). Todos costumam ser revertidos após suspensão da medicação (BRASIL, 2018), entretanto, é causa importante de abandono, tanto pelos efeitos colaterais, quanto pela duração do tratamento (LASCANO; GARCÍA BOURNISSEN; ALTICHEH, 2022; MOLINA et al., 2015).

Neste sentido, trabalhos como o MULTIBENZ (BOSCH-NICOLAU et al., 2024), trazem bons ventos para o futuro. Trata-se de um estudo randomizado, duplo-cego, multicêntrico, de fase 2, que testou o tratamento com BNZ em três regimes diferentes (300 mg/dia por 60 dias, 150 mg/dia por 60 dias e 400 mg/dia por 15 dias), e encontrou resultados semelhantes em relação às respostas parasitológicas. Isso sugere que a redução da dosagem ou da duração do tratamento pode contribuir para melhor adesão e maior cobertura, sem comprometer a eliminação do parasito.

Uma revisão sistemática com meta-análise (NOGUEIRA et al., 2022) que incluiu apenas os ensaios clínicos randomizados que comparavam o esquema padrão com esquemas com doses mais baixas ou por tempo mais curto, encontrou importante variação na frequência de eventos adversos (entre 5% e 75%) e na taxa de

descontinuação (entre 1,5% e 57%), com uma frequência média de eventos graves de 22% (hipersensibilidade, vômitos, polineurite e mielossupressão). Entretanto, esse mesmo estudo encontrou taxa de cura sorológica menores nos esquemas fora do padrão.

Trabalhos mais recentes tem sugerido a possibilidade de outras terapias com objetivo de reduzir o processo inflamatório, especialmente na doença de Chagas crônica (DCC). Vários medicamentos considerados imunomoduladores, incluindo ácido acetilsalicílico, sinvastatina e pentoxifilina, mostraram efeitos promissores em modelos animais, ao reduzir a fibrose e proteger a função cardíaca. Células dendríticas e terapias com células-tronco também estão sendo investigadas como métodos de tratamento, através da redução da inflamação e fibrose cardíacas. Além disso, terapias gênicas focadas em microRNAs como o miR-21 mostraram-se capazes de regular a fibrose e a inflamação cardíacas. Adicionalmente, o uso combinado com tratamento antiparasitário pode melhorar o prognóstico da DCC (SANTOS et al., 2021). Entretanto, na prática, só há disponibilidade das duas formulações descritas aqui (BNZ e NFX).

A taxa de cura varia de acordo com o tipo de infecção: mais de 80% para forma congênita tratada até um ano de vida; em torno de 60% na crônica recente (< 10 anos); e entre 20-40% na crônica tardia (>20 anos) (DE SOUSA et al., 2024; GONZAGA et al., 2023). Um ensaio clínico prospectivo, randomizado e multicêntrico, envolvendo 2.854 pacientes, conhecido como BENEFIT (MORILLO et al., 2015), comparou o tratamento com BNZ com placebo em pacientes com miocardiopatia chagásica instalada, tendo como desfechos analisados em 5 anos: morte, parada cardíaca revertida, taquicardia ventricular sustentada, inserção de marca-passo ou cardioversor, transplante cardíaco, insuficiência cardíaca, acidente vascular encefálico ou outros eventos tromboembólicos. Os resultados encontrados demonstram que o tratamento com BNZ conseguiu reduzir a carga parasitária sem, no entanto, modificar os desfechos pesquisados. Trabalhos posteriores questionaram o poder do estudo, relacionando critérios de inclusão e tamanho da amostra (RASSI; MARIN-NETO; RASSI, 2017).

Há, até o momento, consenso que o ideal do tratamento é intervir ainda na fase aguda, onde ainda é possível alcançar a cura com taxas maiores que 80%. Sabe-se que a terapia antiparasitária nesta fase está associada a redução da parasitemia, da intensidade dos sintomas e da mortalidade (BRASIL, 2018; PAHO, 2019; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). É imperativo que novas iniciativas como a Drugs for Neglected Disease (DNDi) sejam financiadas para desenvolver novos medicamentos ou regimes terapêuticos mais curtos. A partir dela, foi desenvolvida a primeira formulação pediátrica do BNZ.

Estas considerações demonstram a necessidade de se estudar mais a fundo as dificuldades enfrentadas no manejo na doença de Chagas aguda por transmissão oral, sendo o propósito deste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Identificar os aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da Doença de Chagas Aguda em um surto epidêmico em área da baixada maranhense.

3.2. Específicos

- a) Descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos casos diagnosticados com doença de Chagas aguda durante o surto;
- b) Identificar a origem e as possíveis causas para o surto;
- c) Avaliar a taxa de negatificação sorológica em acompanhamento de longo prazo após o tratamento;
- d) Descrever as dificuldades encontradas em uma situação de vida real;
- e) Propor um novo fluxograma diagnóstico da doença de Chagas aguda;
- f) Propor uma rotina de manejo de situações de surto.

4. Produção bibliográfica

4.1. Artigo publicado oriundo dos dados desta tese de doutorado

- a) Periódico: PLOS Neglected Tropical Disease; Qualis A1, fator de impacto 3.4 (SIMÕES-NETO et al., 2024) (Apêndice A).

4.2. Outros artigos publicados no curso do doutorado

- a) Periódico: BMC Infectious Disease; Qualis A3, fator de impacto 2.1 (CUNHA et al., 2020) (Apêndice B);
- b) Periódico: Revista de Saúde Pública, Qualis A3, fator de impacto 2.1 (DA SILVA et al., 2020) (Apêndice B);
- c) Periódico: Infection Control & Hospital Epidemiology, Qualis A2, fator de impacto 3.1 (PORTO et al., 2023) (Apêndice B).

5. METODOLOGIA

5.1. Aspectos éticos

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade federal do Maranhão, sob o protocolo 4.357.642, CAAE 36220620.4.0000.5086.

5.2. Desenho do estudo

Este é uma coorte prospectiva em que pacientes com doença de Chagas aguda envolvidos em um surto de transmissão oral por consumo de bacaba foram acompanhados por um período de 4,5 anos.

5.3. Localização e área do estudo

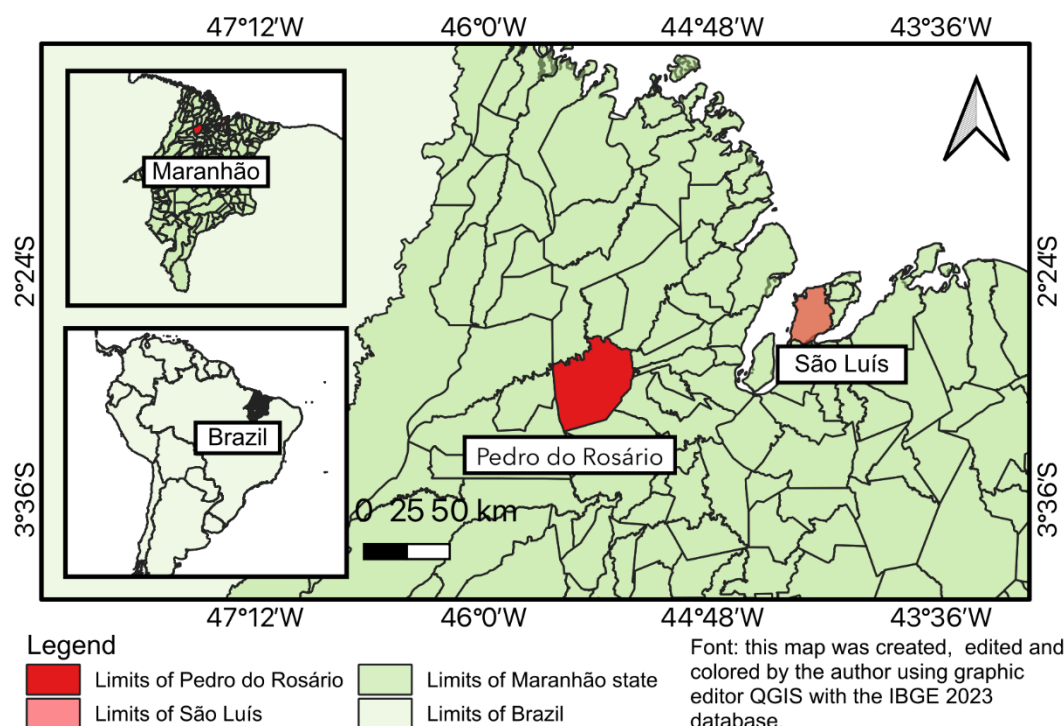
A microrregião da Baixada Maranhense está localizada a oeste e a sudoeste da Ilha de São Luís, no estado do Maranhão/Brasil (Figura 6). É formada por 21 municípios e tem extensão de mais de 20 mil quilômetros quadrados. Está enquadrada na área de transição ou área pré-amazônica. O seu relevo é plano, possuindo uma rica bacia hidrográfica, com formações de grandes lagos que abastecem a região. Devido à importância de sua flora e fauna diversificada, foi criada a Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense (decreto estadual no 11.900, de 11.06.1991).

Um dos municípios que compõem a Baixada é Pedro do Rosário. Possui uma população de 24.320 habitantes e densidade demográfica de 13.87 hab./km². Encontra-se a 23 metros de altitude e a 2°58'38" de latitude sul e 45°20'47" de longitude oeste. Em relação à renda, apenas 7.53% da população possui trabalho formal e 56.5% da população tem rendimento mensal per capita de até meio salário-mínimo (IBGE, 2022).

O IDEB (índice de desenvolvimento da educação básica) é de 4.5, o que o coloca na posição 4.477º/5.570 no país e 114º/217 no estado do Maranhão (IBGE, 2022). No tocante ao território e ambiente, apresenta 4.1% de domicílios com esgotamento sanitário adequado, 59.9% de domicílios urbanos em vias públicas com

arborização e não há vias públicas com urbanização adequada (presença de bueiro, calçada, pavimentação e meio-fio) (IBGE, 2010).

Figura 6 – Mapa de localização geográfica do Município de Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil (Baixada Ocidental Maranhense).



Uma das comunidades é a vila Boa Fé, uma comunidade quilombola que faz parte do povoado Anta, localizada a 2°53'44" de latitude sul e 45°21'43" longitude oeste. Nesta vila ocorreu o surto de doença de Chagas aguda por transmissão oral estudado aqui.

5.4. População do estudo e seguimento

O povoado Anta tinha à época 141 pessoas e 41 edificações. Este trabalho envolveu 85 pessoas com exposição à bebida contaminada e resultou em 39 indivíduos com doença de Chagas aguda. As informações apresentadas são referentes ao período de ocorrência do surto (março de 2018) e após 4,5 anos (2022).

5.5. Critério de inclusão e não inclusão

Os critérios de inclusão foram: ter participado da festividade no dia 21 de janeiro de 2018; e/ou ter ingerido comida ou bebida preparadas no dia da festividade; e aceitar participar do estudo através da assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido ou do termo de assentimento a depender da faixa etária. O critério de não inclusão foi: recusa em participar do estudo.

5.6. Definição de caso de doença de Chagas aguda

Para definição de caso de DCA foram utilizados os critérios amplamente recomendados pelos guias internacionais e nacional (BRASIL, 2018; PAHO, 2019):

- a) critério laboratorial (pelo menos um dos seguintes: exame parasitológico positivo, soroconversão de IgG, aumento de titulação de IgG em pelo menos 2 vezes em um intervalo mínimo de 15 dias);
- b) critério clínico-epidemiológico (todos os seguintes: achados clínicos, vínculo epidemiológico e pelo menos um IgG reagente).

5.7. Investigação epidemiológica

Foi realizado processo investigativo envolvendo entrevistas com a população local, observação da produção da bebida envolvida na transmissão, realização de busca ativa de triatomíneos nos domicílios e peridomicílio, além de distribuição de Postos de Informação de Triatomíneos (PITs) durante 06 meses. O PIT é uma estratégia de vigilância entomológica para monitorar vetores. Consiste em uma caixa contendo informações visuais a respeito dos triatomíneos distribuídas em pontos estratégicos e divulgados entre a população local. Sempre que um morador encontra um artrópode suspeito ele deposita na caixa e comunica a vigilância. Esta, por sua vez, recolhe o inseto, analisa a espécie e faz pesquisa de *T. cruzi* em suas fezes. Os detalhes da metodologia aplicada na execução da pesquisa de *T. cruzi* nos triatomíneos estão descritos em material suplementar (Apêndice C).

5.8. Variáveis clínicas analisadas

Foram avaliadas variáveis relacionadas à apresentação clínica (período de incubação, febre, astenia, linfadenomegalia, calafrios, mialgia, edema facial, dispneia, dor de cabeça, tosse, dor abdominal, edema de membros inferiores, dor torácica, diarreia e chagoma de inoculação). Todos os pacientes foram submetidos a anamnese e exame físico completos realizados por médico Infectologista.

5.9. Diagnóstico laboratorial

Foram utilizados os seguintes exames laboratoriais específicos para o diagnóstico de doença de Chagas:

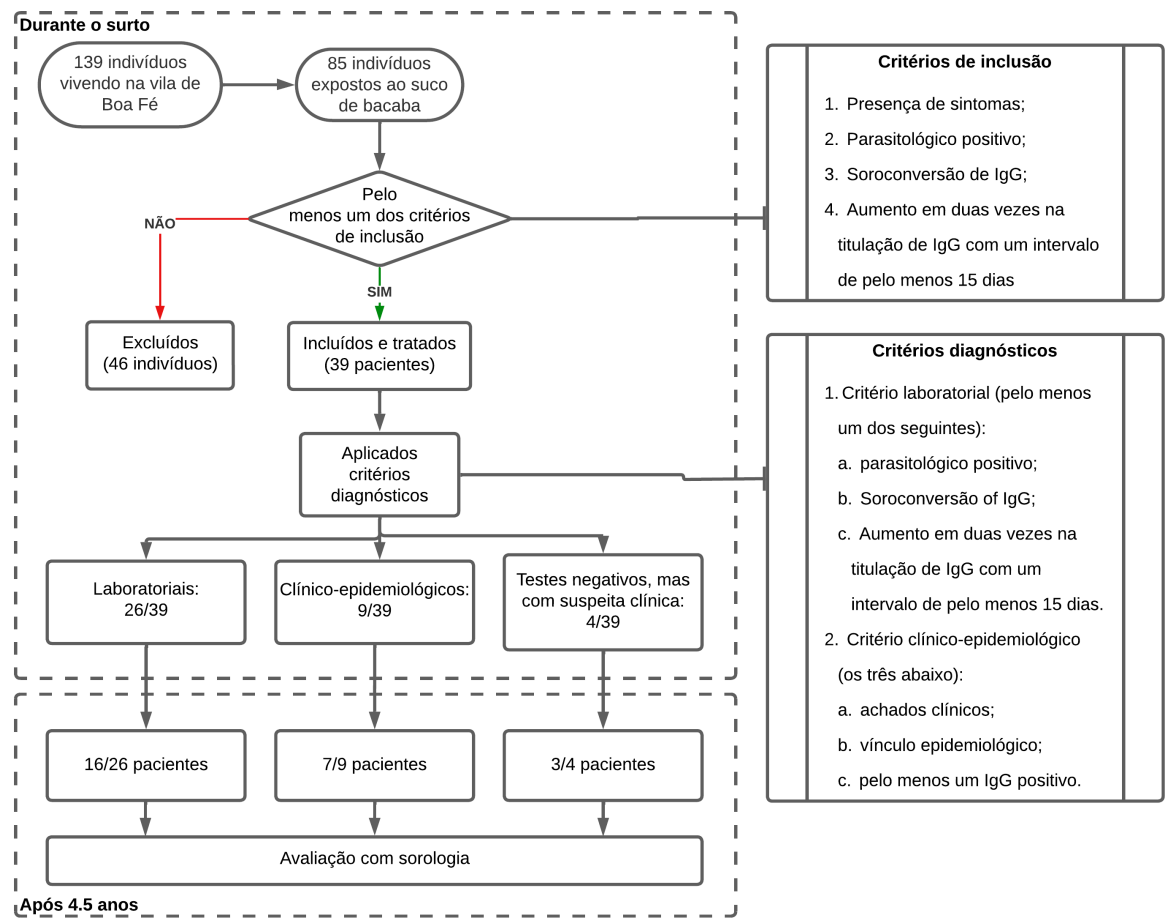
- a) Parasitológico direto pelo método de gota espessa por coloração Giemsa da Merck;
- b) Teste sorológicos por ELISA da Bioclin, HAI da Wama Diagnostica, IFI da BioManguinhos;
- c) PCR convencional *in house*.

Detalhes da metodologia aplicada na execução dos exames, incluindo PCR, estão descritos em material suplementar (Apêndice C).

5.10. Tratamento realizado

Todos os pacientes foram tratados com a única droga disponível no Brasil, o Benzonidazol, por um período mínimo de 30 dias, nas seguintes dosagens: adultos com 5mg/kg/dia (máximo de 300mg/dia) e crianças com 5-10mg/kg/dia. Foram coletados os seguintes dados relacionados ao tratamento: tempo para início de tratamento e duração do tratamento. A Figura 7 demonstra os critérios de seleção e seguimento dos indivíduos.

Figura 7 – Critérios de seleção, critérios diagnósticos e seguimento da população afetada pelo surto de doença de Chagas aguda em Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil.

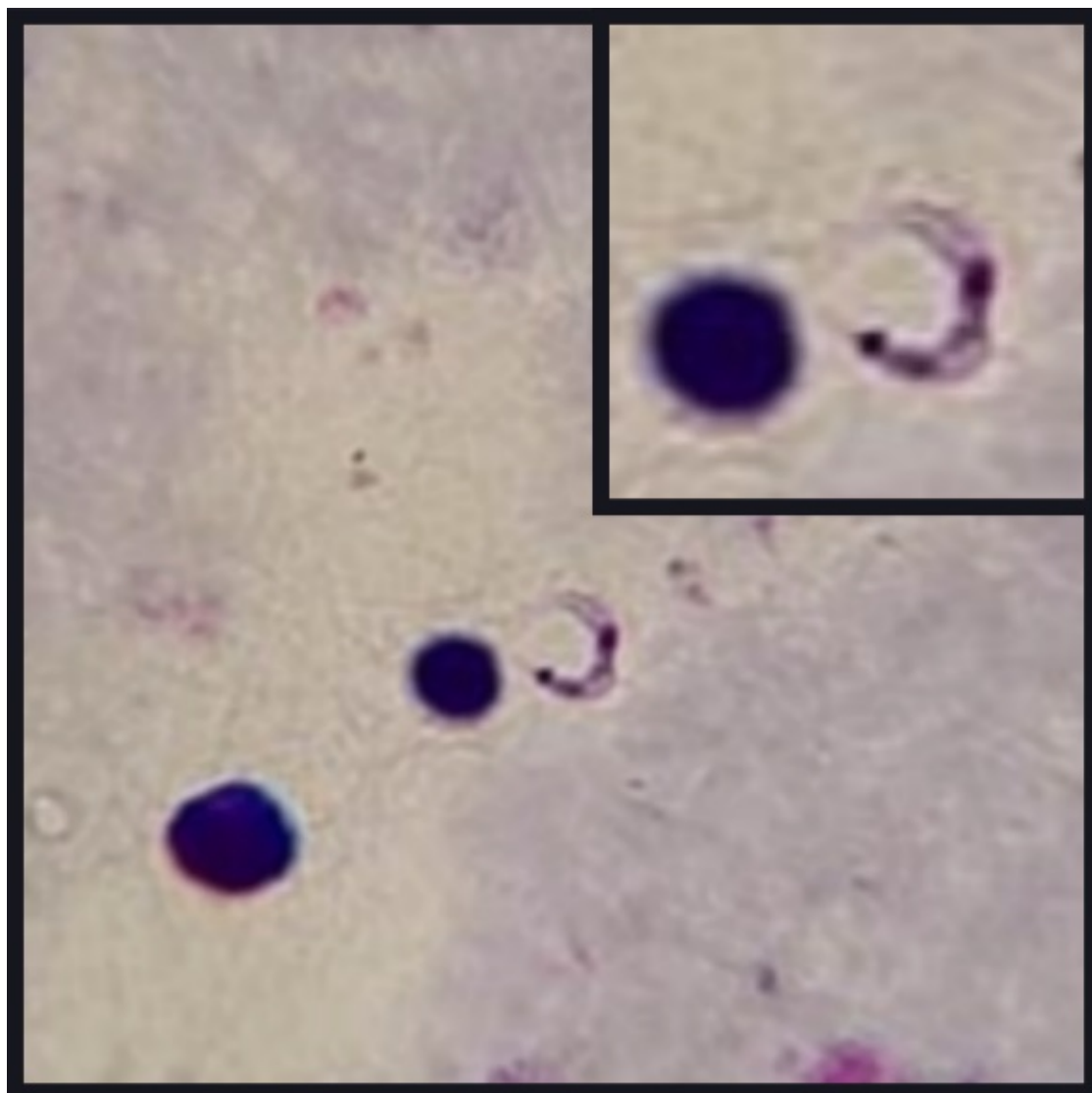


6. RESULTADOS

6.1. Relato do surto e investigação epidemiológica

Em 15 de fevereiro de 2018, uma mulher de 69 anos da vila Boa Fé, em Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil, compareceu à Unidade Regional de Saúde de Pinheiro, Maranhão, Brasil, para realizar um terceiro exame de parasitológico em gota espessa para malária. A paciente já havia sido internada e liberada do hospital municipal duas vezes com duas gotas espessas negativas para malária. Ela apresentava histórico de 11 dias de febre vespertina, calafrios, mialgia, astenia e dor abdominal. O técnico do laboratório requisitou as duas primeiras lâminas para revisão e ambas apresentaram resultado positivo para formas tripomastigotas de *T. cruzi*, confirmando assim DCA (Figura 8). Não houve necessidade de realizar a terceira coleta. Ela foi tratada com BZD na dose de 300 mg/dia e tornou-se assintomática em menos de uma semana.

Figura 8 - Forma tripomastigota de *T. cruzi* (seta) em sangue periférico do caso índice, corado usando a técnica de Giemsa (microscopia óptica, ampliação de 1000x).



Fonte: próprio autor.

O técnico do laboratório deu início a uma investigação e descobriu que outras pessoas que viviam na mesma vila também apresentavam sintomas semelhantes. Além disso, todos eles tinham comparecido a uma celebração em 21 de janeiro (três semanas antes) na qual foi servido suco de bacaba, que foi a provável fonte de transmissão. A partir daí, foi destacada uma equipe da Secretaria de Estado da Saúde do Maranhão (SES/MA) para a localidade.

A entrada para a vila de Boa Fé fica no povoado Anta, localizado a 2°54'33"S e 45°19'15"O. A estrada até a vila é de cerca de 4,7 quilômetros, não pavimentada e possui dois córregos sem pontes construídas, impossibilitando a passagem de carros,

sendo seu acesso apenas à pé, à cavalo ou de motocicleta, conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Estrada do povoado Anta para a vila Boa Fé, Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil, 2018.



Fonte: próprio autor.

Os moradores desta vila vivem em extrema pobreza, em casas de taipa (Figura 10), sem saneamento básico e com poucos recursos de saúde. área é habitada por diversas espécies que atuam como reservatórios do *T. cruzi*, mas a mais provável envolvida neste surto foi a “mucura”, uma espécie de marsupial da família Didelphidae (BARROS; DE AGUIAR AZEVEDO, 2014), que tem o hábito de viver ou se esconder na copa das palmeiras. Os triatomíneos, que se alimentam do sangue desses mamíferos, também fazem sua casa no mesmo local. Quando o fruto é extraído e processado, os insetos podem ser acidentalmente esmagados e os infectados pelo *T. cruzi* acabam contaminando a bebida. As espécies mais frequentes no estado são dos gêneros *Pangystrogylus* e *Rhodnius* (JURBERG et al., 2014). No entanto, os dados são antigos, pois o monitoramento de rotina não está sendo feito pelos municípios e pelo estado.

Figura 10 - Casa típica (de “taipa”) na vila Boa Fé, povoado Anta, município de Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil, 2018.



Fonte: próprio autor.

O fruto envolvido foi a o *Oenocarpus bacaba* (“bacaba”), que é uma palmeira nativa da Amazônia e seu fruto se assemelha ao da *Euterpe edulis* (“juçara” ou “açai”). Pode atingir até 20 metros de altura e 20 a 25 centímetros de diâmetro (Figura 11). Seu fruto é amplamente consumido na região e muitas vezes é a única fonte de alimento para a população local. É tradição nesta comunidade realizar uma celebração todos os anos durante o período sazonal da bacaba, que ocorre entre dezembro e abril.

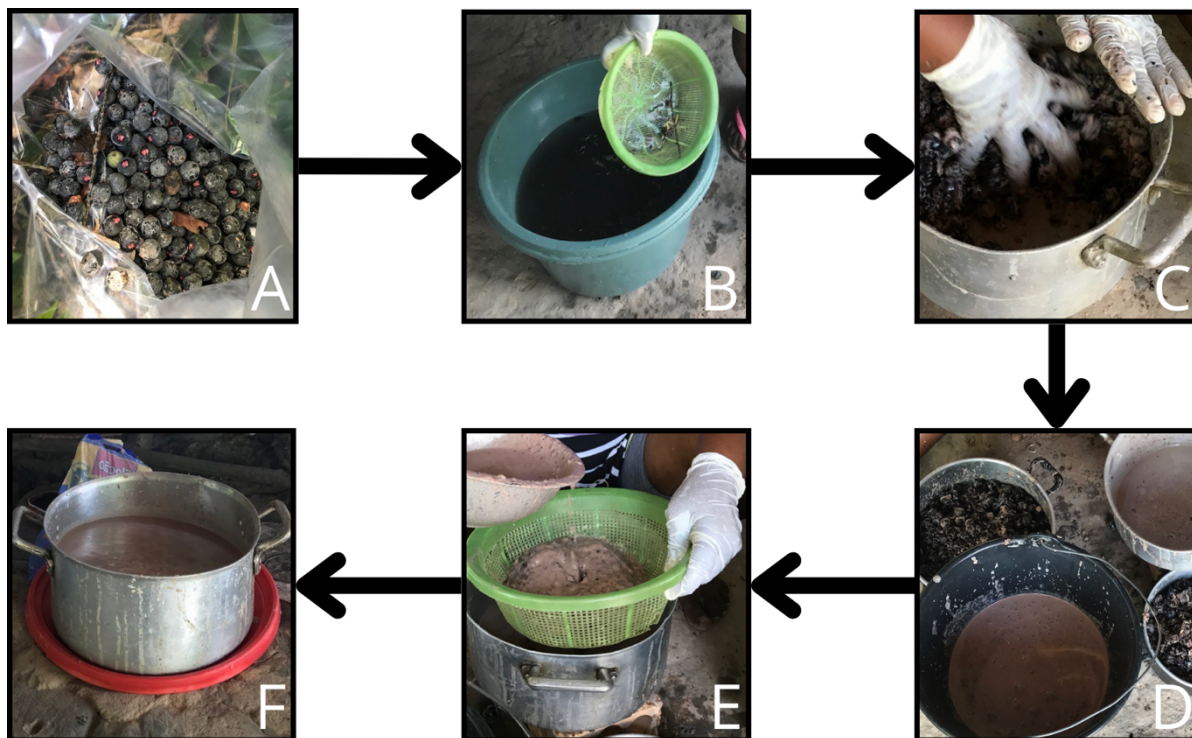
Figura 11 - Palmeira *Oenocarpus bacaba* (A) e seu fruto (B).



Fonte: próprio autor.

O processo de produção do suco é completamente artesanal e não segue as boas práticas de manipulação de alimentos. Ele foi repetido no momento da visita da equipe, conforme demonstrado na Figura 12.

Figura 12 – Processo de produção artesanal do suco de bacaba realizado na vila Boa Fé, Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil.



Legenda: (A) o cacho da bacaba é colocado em um saco plástico no chão de onde os frutos são retirados; (B) os frutos são então colocados em um balde com água não tratada onde permanece por alguns minutos para remover o excesso de palha e madeira; (C) a água é então removida e os frutos são esmagados manualmente para extrair o suco; (D e E) o líquido é então passado por uma peneira para remover as sementes e cascas dos frutos; (F) por fim, o líquido é levemente aquecido em fogo à lenha, mas não atinge ferver. Após esfriar, o suco é servido.

Dentro de duas semanas após o primeiro caso, 85 pessoas foram avaliadas em busca de sintomas, realizando sorologia e exame parasitológico direto. Um surto de 39 casos de DCA foi diagnosticado e o tratamento foi iniciado para todos esses indivíduos.

Para a investigação entomológica, foram distribuídos pela comunidade PITs e mantidos por seis meses. Foram encontrados 25 exemplares de *Rhodnius pictipes* (Stal, 1872) (Hemiptera, Reduviidae) e 02 de *R. robustus* (Larrousse, 1927), todos em áreas peridomiciliares, com taxa de infecção por *T. cruzi* de 33,3% (Tabela 3). Não foram encontrados exemplares de nenhuma espécie no interior das casas.

Tabela 2 – Número de triatomíneos capturados e taxa de infecção natural por *T. cruzi*, por mês, em vila Boa Fé, Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil, março a outubro de 2018.

Mês	Triatomíneos capturados (n)	Taxa de infecção natural por <i>T. cruzi</i> (n / %)
Março	3	0 / 0
Abril	5	1 / 20%
Maio	3	1 / 33.3%
Junho	2	2 / 100%
Setembro	6	2 / 33.3%
Outubro	8	3 / 37,5%
Total	27	9 / 33.3%

6.2. Características demográficas, clínicas e laboratoriais

As características demográficas e clínicas do surto estão resumidas na Tabela 4. A mediana de idade dos pacientes foi de 32 anos (variando de 10 meses a 78 anos). Não houve diferença na distribuição de gênero (20 mulheres e 19 homens). A mediana do período de incubação foi de 13,8 dias (variando de 2 a 28 dias). A mediana de tempo entre o início dos sintomas e o tratamento foi de 16,6 dias (variando de 6 a 54 dias). Os sintomas mais frequentes foram febre e linfadenopatia (90%; 35/39), astenia (56%; 22/39), calafrios (51%; 20/39), mialgia (48%; 18/39), edema facial e dispneia (38%; 15/39) e cefaleia e tosse (31%; 12/39). Não houve pacientes com sinal de Romaña. Uma descreveu o que poderia ser um chagoma de inoculação em perna, entretanto, não visualizado durante o atendimento.

Tabela 3 – Características demográficas e clínicas do surto de 39 casos de doença de Chagas aguda por transmissão oral, agrupadas por categoria, em Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil, 2018.

Variável	Resultado
Gênero (M:F)	20:19

Idade (mediana; anos)	32 (10m-78a)
Período de incubação (mediana; dias)	13,8 (2-28)
Tempo entre início dos sintomas e tratamento (mediana; dias)	16,6 (6-54)
Sintomas mais frequentes (%; n)	febre e linfadenopatia (90%; 35); astenia (56%; 22); calafrios (51%; 20); mialgia (48%; 18); edema facial (38%; 15); dispneia (38%; 15); cefaleia (31%; 12); tosse (31%; 12); dor abdominal (28%; 11); dor torácica (8%, 3); diarreia (8%; 3).

M: masculino; F: feminino; m: meses; a: anos

Dos 39 casos, 66,6% (26/39) foram diagnosticados por critérios laboratoriais e 23% (9/39) por critérios clínico-epidemiológicos, enquanto 10,2% (4/39) tiveram testes negativos, mas foram considerados casos de DCA devido à alta suspeita clínica, conforme mostrado na Figura 1. Realizamos parasitológico em gota espessa e duas avaliações sorológicas sequenciais com 50 dias de intervalo. As taxas de positividade dos testes foram as seguintes: esfregaço de sangue periférico em 69,7% (23/33) dos casos; primeira amostra sorológica em 66,6% (26/39) dos casos e soroconversão OU aumento de 2x no título de IgG em 17,7% (6/35) dos casos. A positividade geral dos testes sorológicos foi de 91,4% (32/35). Amostras sequenciais não foram coletadas a tempo em quatro pacientes. A mediana de tempo entre início de sintomas e coleta da gota espessa foi de 16 dias.

As amostras de soro foram armazenadas em freezer a -80°C no Laboratório Central do Maranhão (LACEN/MA). Após 02 anos foram processadas e realizado PCR convencional em 33 amostras, sendo possível amplificar o DNA no *T. cruzi* em 100% delas. Isso incluiu seis dos nove pacientes diagnosticados por critérios clínicos-epidemiológicos (gota espessa negativa) e todos os quatro pacientes com sorologia e gota espessa negativa. As sequências dessas amostras foram depositadas no GenBank sob os seguintes números de acesso: ON037202 a ON037234.

Todos os 39 pacientes foram tratados com BNZ: adultos com 5 mg/kg/dia (máximo de 300 mg/dia) e crianças com 5-10 mg/kg/dia, por 60 dias. Apenas dois pacientes abandonaram o tratamento antes do fim do esquema, mas completaram pelo menos 30 dias de tratamento. Um deles teve que ser hospitalizado devido a reação medicamentosa com eosinofilia e sintomas sistêmicos (DRESS), que foi resolvida com corticosteroides e anti-histamínicos. Não houve mortes devido a este surto.

Após o período de 4,5 anos, foram realizados IgG (ELISA e IFI) em 26 indivíduos (perda de 25%), que mostraram que a cura sorológica (testes negativos) foi alcançada em 30,7% dos casos (8/26), redução de títulos de IgG em 7,6% dos casos (2/26). Para 30,7% dos casos (8/26) houve aumento nos títulos de IgG ou soroconversão e 26,9% dos casos (7/26) mantiveram o nível. Os demais pacientes foram perdidos no acompanhamento porque mudaram de local de residência para outro estado. As características demográficas, clínicas, critérios diagnósticos e resultados de testes de cada paciente do surto estão resumidos em material suplementar (Apêndice C).

7. DISCUSSÃO

7.1. Relato do surto e investigação epidemiológica

Aqui apresentamos um surto epidêmico de doença de Chagas aguda (DCA) devido à transmissão oral em uma população de alta vulnerabilidade no estado do Maranhão, Brasil. Foi o maior surto relatado até o momento na região nordeste. Isso implica aos governos local e estadual que concentrem as suas ações na promoção de melhorias no saneamento básico, além de desenvolver um programa de produção de alimentos seguros para a população. No momento do presente estudo, não há registro de políticas públicas que incluam a produção artesanal de subsistência segura desses alimentos.

Após esse surto, uma série de treinamentos foram realizados com a equipe de saúde do município e a comunidade, com o objetivo de conscientizar sobre a importância da doença de Chagas e treinar sobre o processamento seguro, de acordo com os guias nacionais (SEBRAE, 2013). Dado que os alimentos envolvidos em sua transmissão são a única fonte de sobrevivência para a maioria das pessoas na região, deixar de comê-los não é uma opção. A população foi treinada para produzir esses alimentos de forma mais segura, mantendo o processo artesanal, mas isso não constituiu uma política de orientação estendida a todo o estado.

Na via de transmissão oral, o triatomíneo é acidentalmente macerado junto com frutas ou alimentos que são diretamente contaminados por suas fezes quando deixados desprotegidos. A vigilância entomológica é de grande importância para melhor compreensão do ciclo de vida e persistência do *T. cruzi* na natureza. Foram distribuídos PITs por toda a comunidade e mantidos por seis meses. Neste estudo, foram encontrados 27 triatomíneos viáveis, dos quais mais de 90% eram *Rhodnius pictipes*, todos em áreas peridomiciliares. Nenhuma espécie foi encontrada dentro de casas. Anteriormente, apenas dois surtos (no Brasil e na Colômbia) relataram esse vetor como provavelmente envolvido na transmissão (HERNÁNDEZ et al., 2016; VALENTE et al., 2009b), mas sua capacidade de transmitir a doença foi recentemente

demonstrada em um estudo experimental (DE ABREU et al., 2022). A espécie mais frequentemente envolvida na Colômbia e Venezuela é *P. geniculatus*. No Brasil, foi encontrada maior variabilidade de espécies, mas a maioria delas pertenceu aos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* (JURBERG et al., 2014).

A taxa de infecção natural encontrada neste estudo foi de 33,3%. Apesar de ser maior do que na maioria das vigilâncias no Brasil, está alinhado com os achados de estudos em outros estados, onde foram encontradas taxas acima de 30% e até acima de 70% em áreas peridomiciliares (BARBOSA-SILVA et al., 2019; PAIXÃO et al., 2024).

A maioria dos casos de DCA por transmissão oral ocorre após a ingestão de sucos frescos, como juçara e cana-de-açúcar. No entanto, outras bebidas também já foram citadas (DE NOYA et al., 2010). Neste evento, a fonte mais provável foi o suco de bacaba. Esta foi a primeira vez que este fruto foi envolvido em um surto no estado do Maranhão e o segundo no Brasil. A primeira publicação foi de um caso que evoluiu a óbito no Rio Grande do Norte (ESPER et al., 2019). À primeira vista, pode parecer que este é um problema restrito a locais remotos e altamente vulneráveis, mas um estudo demonstrou a presença de *T. cruzi* em produtos de açaí vendidos em mercados no Rio de Janeiro, Brasil, fora da região amazônica (FERREIRA et al., 2018).

Além disso, devido à intensa migração humana e exportação de produtos naturais de áreas endêmicas, a DC já pode ser considerada um problema de saúde global. Artigos publicados em países europeus apontam essa preocupação (GONZALEZ-SANZ et al., 2023). Também é importante mencionar um estudo que demonstrou a presença de triatomíneos infectados em uma área densamente povoada na região nordeste dos Estados Unidos, uma área não endêmica (PETERSON et al., 2024). Portanto, há necessidade urgente de implementar programas de produção de alimentos seguros.

Um questionamento importante a ser feito diante deste surto é: já que o consumo do suco de bacaba é uma tradição sazonal, por que naquele momento específico tantas pessoas foram afetadas? Uma das possibilidades é que, na

realidade, todo ano tenhamos casos de DCA naquele município e o sistema de saúde municipal não é capaz de detectar. Alguns dos afetados seriam, então, previa e rotineiramente expostos ao *T. cruzi*, sendo este um surto de reinfeção, que foi detectado pois uma das pacientes procurou espontaneamente a Regional de Saúde. A outra possibilidade é a de ter ocorrido alguma alteração ambiental significativa naquela área. Podemos estar diante disso, pois em um boletim divulgado em 2018 pela Secretaria de Estado de Meio Ambiente do Maranhão (SEMA), que analisou os focos de queimada no estado do Maranhão ocorridos entre 1º e 15 de janeiro (uma semana antes do festejo), informa que ocorreu uma grande queimada na área próxima à vila. Isso pode ter obrigado os reservatórios animais a buscarem abrigo, encontrando na vila um local mais seguro (MA, 2018).

A DC é um exemplo emblemático de enfermidade negligenciada, com impacto significativo em populações vulneráveis, particularmente em áreas de baixa renda e com acesso limitado aos serviços de saúde. O conceito de Uma Só Saúde, que integra as dimensões humana, animal e ambiental, é fundamental para o controle da doença, considerando sua complexidade ecológica e epidemiológica. A interação entre vetores, como triatomíneos, hospedeiros animais e seres humanos evidencia a necessidade de estratégias interdisciplinares e colaborativas. As alterações ambientais, como desmatamento e urbanização desordenada, contribuem para a expansão da área de risco, promovendo o contato entre vetores e humanos. Além disso, a domesticação dos triatomíneos e a persistência do ciclo zoonótico reforçam a importância de ações integradas em saúde pública, manejo ambiental e vigilância veterinária. Portanto, abordar a DC sob a perspectiva da Uma Só Saúde é essencial para desenvolver soluções sustentáveis e efetivas, promovendo maior equidade em saúde.

7.2. Características demográficas, clínicas e laboratoriais

Neste estudo foram encontradas alta frequência de febre e linfadenopatia (90%) e baixa frequência de edema facial (38%), o que está de acordo com outros relatos (BASTOS et al., 2010; SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; VARGAS et al., 2018).

A dificuldade em estabelecer o diagnóstico foi demonstrada aqui. As ferramentas disponíveis que são recomendadas nas diretrizes são de baixa eficiência, pois exigem várias visitas e envolvem processos complexos e muitas vezes rudimentares. O padrão ouro no diagnóstico de DCA são os métodos parasitológicos diretos, mas estes têm sensibilidade variável, pois são dependentes do operador e precisam ser repetidos em múltiplas amostras (BRASIL, 2024a; PAHO, 2019). Portanto, a recomendação é combinar métodos (BRASIL, 2024a).

A melhor sensibilidade dos parasitológicos diretos são do exame a fresco. Entretanto, considerando que a região do presente estudo é endêmica para malária, a técnica de gota espessa é a ferramenta mais disponível e facilmente realizada pela maioria dos municípios, sendo utilizada neste trabalho. Foi encontrada positividade de 69,7% em amostra única, o que é maior do que o encontrado em algumas publicações (NOYA et al., 2012). Em um surto na Venezuela com mais de 100 pacientes, pesquisadores avaliaram o rendimento dos exames diagnósticos e encontraram positividade do parasitológico direto em 77% dos casos quando realizados 3 a 4 exames por indivíduo (NOYA et al., 2012).

Infelizmente, devido à dificuldade logística na coleta de amostras em área remota, não foi possível realizar a repetição do exame. Além disso, tem havido escassez de técnicos qualificados para realizar microscopia de boa qualidade ao longo dos anos, representando assim uma ameaça ao diagnóstico de DCA. No estado do Maranhão grande parte está aposentado ou em vias de aposentadoria e ainda não há capacidade para substituição. Muitos postos de trabalho vazios nesta área, a despeito de regulamentação e de fomento do governo federal para este cargo (Portaria de consolidação Nº 1 de 2 de junho de 2021).

A sorologia é considerada o método de maior sensibilidade. Neste surto, foram realizados dois testes sorológicos sequenciais, com intervalo de 50 dias entre eles. ELISA e IFI foram utilizados para a primeira amostra e ELISA e HAI para a amostra subsequente. Encontramos positividade de 66,6% (26/39) na primeira amostra e 17,7% de soroconversão (6/35). Quatro pacientes não fizeram a análise sequencial. A positividade geral dos testes sorológicos foi de 91,4% (32/35). Este resultado é condizente com os de várias outras publicações (DE CASTRO et al., 2006;

SUÁREZ et al., 2022). Uma fragilidade desta análise foi a não utilização da IFI na segunda amostra, pois o laboratório de referência não possuía os kits. Caso fosse realizado poderíamos encontrar valores maiores pela identificação de aumento da titulação. Não foi possível também realizar IgM, devido às limitações mencionadas anteriormente. Se este teste tivesse sido realizado, poderíamos ter encontrado valores maiores, mas com resultados conflitantes, pois o surto ocorreu em região de confluência de endemias.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta que pode auxiliar no seguimento dos pacientes com DC. Seu uso não é padronizado, está restrito a pesquisas e laboratórios de referência e tem sido mais utilizado como critério de falha terapêutica (BRITTO, 2009). Neste trabalho foi possível realizar cPCR em 33 amostras da fase aguda, com resultado positivo em 100% delas. Os primers específicos foram previamente descritos na literatura (WINCKER et al., 1994). Isso incluiu seis dos nove pacientes com gota espessa negativa e todos os quatro pacientes com sorologia e gota espessa negativa, o que está alinhado com outros estudos (DE SOUZA-LIMA et al., 2013; SANTANA et al., 2019b). Esse resultado reforça a necessidade urgente de padronização de pelo menos uma técnica de biologia molecular para diagnóstico de rotina de DCA. Outra limitação deste trabalho foi a não identificação da linhagem genotípica do *T. cruzi*., o que poderia fornecer informações relevantes sobre virulência e origem.

O acompanhamento clínico foi feito a contento, entretanto, os exames não foram realizados, devido às limitações do município. Foi feita parceria com Hospital Universitário Presidente Dutra (HU-UPD) para que os pacientes fossem encaminhados para realização de eletrocardiograma, ecodopplercardiografia e exames de sangue, entretanto, o município de Pedro do Rosário não conduziu os pacientes até o HU-UPD. Esta é uma grande limitação deste estudo e demonstra o quão vulnerável é a situação das pessoas afetadas pela DC.

Felizmente, após 54 meses (4,5 anos), foi possível realizar testes sorológicos (ELISA e IFI) em 26 indivíduos. Encontramos cura sorológica (testes negativos) em 30,7% e diminuição dos títulos de IgG em 7,6%, enquanto em 30,7% houve aumento de títulos ou soroconversão de IgG e 26,9% tiveram estabilidade nas titulações. Os

outros pacientes foram perdidos no acompanhamento porque mudaram de residência para outro estado. Considerando que a negatividade ou declínio de anticorpos alcançado em 4,5 anos após o surto foi de menos de 40%, essas taxas foram bem menores do que outros relatos de DCA (até 70% após 5 anos) (BUSS et al., 2020).

Algumas possibilidades são aventadas para essa discrepância. Como a região é endêmica e com alta taxa de infecção natural de triatomíneos, existe a possibilidade destes pacientes já terem sido expostos previamente ao *T. cruzi*, já que 66% dos pacientes tinham IgG positivo logo na primeira amostra. Outra possibilidade é reexposição contínua ao parasita. Tanto uma quanto outra possibilidade contribuiriam para uma taxa de negatificação sorológica mais baixa.

Uma importante limitação deste estudo foi a não realização de análise sorológica em intervalos de tempo mais curto (a cada 6 ou 12 meses). Isso teria permitido uma melhor avaliação da cinética dos anticorpos e determinação de cura.

Todos os pacientes deste surto foram tratados com o único medicamento disponível no Brasil, BNZ. Apesar de relatos de alta taxa de reações adversas e de abandono, a suspensão da medicação neste estudo só foi necessária em dois pacientes, e ambos os indivíduos receberam o tratamento por 30 dias, um período considerado adequado. No entanto, o manejo do tratamento foi bastante árduo, dada a necessidade de uso de medicação sintomática na maioria dos casos. Uma paciente necessitou de internação por ter apresentado reação medicamentosa com eosinofilia e sintomas sistêmicos (síndrome DRESS), entretanto, revertida com suspensão do BNZ e uso de corticoide e anti-histamínico.

A letalidade de um surto é bastante variável e pode ser influenciada por quatro fatores: o genótipo do patógeno; a carga parasitária ingerida; a suscetibilidade dos indivíduos; e se o tratamento foi iniciado precocemente. Uma meta-análise recente demonstrou que a letalidade geral da DCA por transmissão oral é de cerca de 1%, mas também mostrou que a letalidade pode chegar a mais de 30% em grandes surtos (com mais de 10 pacientes) (BRUNETO et al., 2021). Não foi possível analisar os três primeiros fatores mencionados acima. Em relação ao tratamento precoce, o tempo médio entre o início dos sintomas e o tratamento foi de 16,6 dias (variando de 6 a 54

dias). Não houve mortes oriundas deste surto. Isso demonstra que a ação foi implementada rapidamente pelo centro de vigilância, o que pode ter impactado na ausência de desfechos letais.

7.3. Percepções clínico-epidemiológicas e proposições:

Em 2021, o Índice de Desenvolvimento Humano do estado do Maranhão foi de 0,676, o menor do Brasil. Desnutrição, exclusão social e saneamento básico deficiente são uma chaga no estado. Os dados são alarmantes: mais de 50% da população vive com uma renda per capita inferior a US\$ 81 por mês; apenas 56,5% da população do Maranhão tem acesso a um sistema de água encanada; e 43,5% não tem acesso a água potável (IBGE, 2022).

Todos esses fatores associados deram origem a uma explosão de doenças endêmicas neste estado, incluindo aumento do número de casos e surtos de DCA. Até 2010, os casos notificados no Maranhão eram apenas pela via vetorial clássica, em um ambiente predominantemente rural (BRASIL, 2024c). A maioria dos casos de DCA por transmissão oral era importada do estado do Pará. Nos últimos 15 anos, foi relatado um aumento de casos autóctones por essa via, tornando a DCA uma doença emergente (BRASIL, 2024c). Este dado é reforçado por uma tese de doutorado publicada em 2017, que demonstra que o aumento passa a ocorrer a partir de 2010 (CUTRIM, 2017).

A possibilidade de DC adquirida por via oral deve ser sempre suspeitada em situações em que exista um vínculo epidemiológico, como em áreas endêmicas ou com mais de um caso simultâneo com ingestão de alimento suspeito. Entretanto, a inespecificidade dos sintomas leva a uma ampla gama de diagnósticos diferenciais, como leishmaniose visceral, malária, Salmonelose, mononucleose, citomegalovirose, síndrome retroviral aguda, toxoplasmose, linfoma, leucemia, lúpus, entre outros. Uma pista clínica importante é a presença de febre por mais de uma semana, associada a linfadenopatia e edema facial ou bipalpebral, apesar de que, estes dois últimos são poucos frequentes.

As limitações deste estudo estão todas relacionadas às limitações de recursos dos municípios e do estado, bem como à própria característica de uma doença negligenciada. Não foi possível realizar avaliação cardiológica adequada em todos os pacientes, restringindo a análise clínica; não foi possível realizar outras coletas em intervalos mais curtos, impossibilitando a análise da cinética sorológica; nem foi possível coletar novas amostras de PCR.

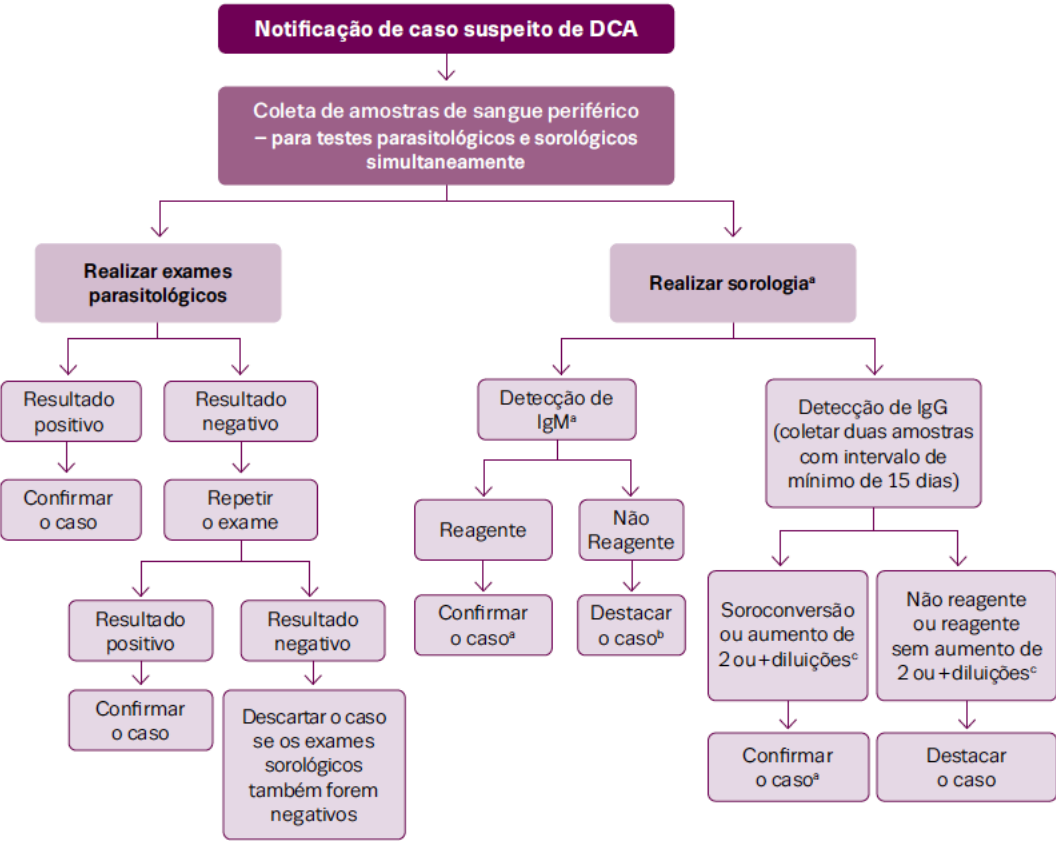
Este evento demonstra que ainda há um longo caminho a percorrer antes que esta doença seja controlada. Conforme mencionado anteriormente, o status da DC como uma doença tropical negligenciada significa que controlá-la ou erradicá-la por meio da aplicação de estratégias de saúde pública continua possível. Apesar da natureza contemporânea das dificuldades descritas aqui, elas permanecem muito semelhantes às da época de sua descoberta. Mesmo depois de mais de um século, Carlos Chagas ainda está certo quando disse:

“Poder-se-há, na higiene pública, encontrar meios eficazes de atenuação do mal? Acreditamos que sim, se tal problema, seguramente um problema de Estado e de humanidade, se tornar preocupação de um estadista cientificamente bem orientado.” (KROPF; LACERDA, 2009)

À medida que a globalização rompe todas as fronteiras por meio da migração de pessoas e da exportação de matérias-primas, postulamos aqui que devemos espalhar os pensamentos de Carlos Chagas por todo o mundo. No entendimento de que as medidas para alcançar o controle da DC devem envolver o conceito de “Uma Só Saúde”, com abordagens múltiplas que contemplem tanto a quebra da vulnerabilidade social quanto o investimento em tecnologias diagnósticas mais eficientes e terapêuticas mais eficazes, bem como a proteção do meio ambiente.

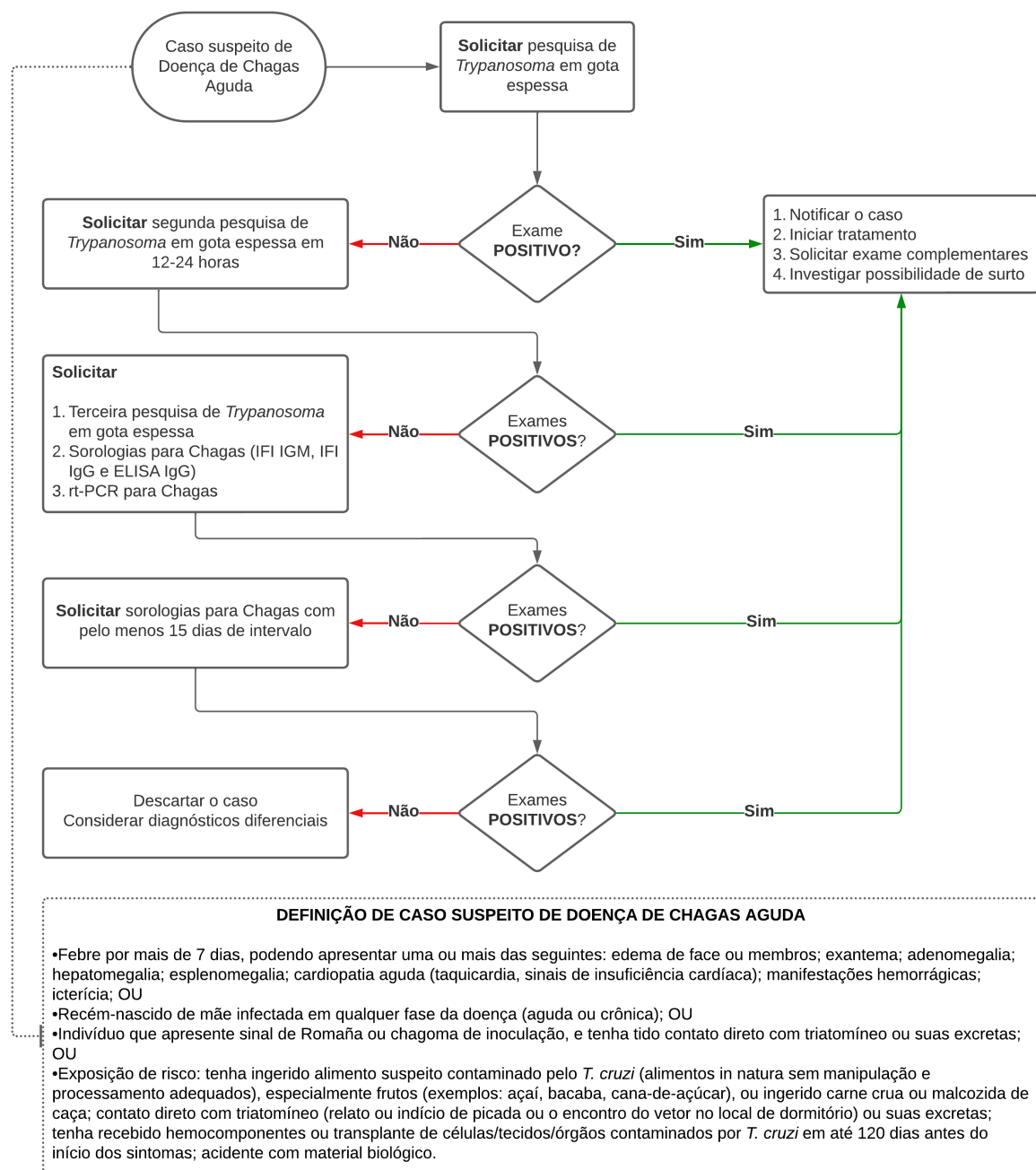
Na rotina diagnóstica da DCA proposta pelo Guia de Vigilância em Saúde de 2024 não inclui métodos moleculares (Figura 13). Propomos aqui uma mudança no fluxograma diagnóstico, incluindo o PCR como ferramenta elementar (Figura 14). Desta maneira acreditamos que melhorariamos bastante o diagnóstico, bem como o monitoramento do perfil genotípico encontrado em nosso país.

Figura 13 - Fluxograma para confirmar ou descartar casos suspeitos de doença de Chagas aguda, segundo critério laboratorial



Fonte: Guia de Vigilância em Saúde, 2024 (BRASIL, 2024a)

Figura 14 – Proposta de fluxograma diagnóstico de doença de Chagas aguda



Elaboração: próprio autor

Ademais, propomos aqui uma padronização no manejo de surtos por transmissão oral, com rotina de exames a serem realizados na fase aguda e no acompanhamento dos casos (Figura 15). Desta maneira entendemos que teremos um melhor acompanhamento dos casos e compreensão tanto dos fatores envolvidos nas causas como nas consequências da DCA.

Figura 15 - Proposta de padronização de exames e ações a serem realizadas na investigação de surtos, na fase aguda e no seguimento casos de DCA

	Ações / Exames Fase aguda	Tempo de repetição Fase aguda	Tempo de repetição Seguimento
 Avaliação do paciente	Parasitológico direto IgG (com titulação) IgM (com titulação) Biologia molecular com pesquisa de DTU Hemograma, provas de função hepática e renal Radiografia de torax, ECG e ECOcardiografia	Se negativo, repetir a cada 12-24 horas. Duas amostras com intervalo de pelo menos 15 dias Duas amostras com intervalo de pelo menos 15 dias Pelo menos uma amostra Pelo menos uma amostra Pelo menos uma avaliação	Não é necessário A cada 6-12 meses (até negatização) Não é necessário 6 a 12 meses (pelo menos 5 anos) A depender da gravidade 6 a 12 meses (toda a vida)
 Avaliação do vetor	Busca ativa de vetores e distribuição de PITs Parasitológico direto (fezes) Biologia molecular com pesquisa de DTU (fezes)	Mensal durante 06 meses Mensal durante 06 meses Na investigação inicial	6 meses (pelo menos 5 anos) 6 meses (pelo menos 5 anos) Não é necessário
 Avaliação do reservatório	Busca ativa de possíveis reservatórios Parasitológico direto (sangue) Biologia molecular com pesquisa de DTU (sangue)	Mensal durante 06 meses Mensal durante 06 meses Na investigação inicial	6 meses (pelo menos 5 anos) 6 meses (pelo menos 5 anos) Não é necessário
 Avaliação da fonte	Busca de possíveis amostras armazenadas Biologia molecular com pesquisa de DTU (amostras) Busca de utensílios utilizados na fabricação Biologia molecular com pesquisa de DTU (utensílios)	Na investigação inicial Na investigação inicial Na investigação inicial Na investigação inicial	Não é necessário Não é necessário Não é necessário Não é necessário

Elaboração: próprio autor

8. CONCLUSÃO

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada clássica. A capacidade de manter o hospedeiro praticamente assintomático por muito tempo permite que ela prospere na natureza. Este foi o maior surto DCA fora da região norte. Encontramos um perfil epidemiológico muito semelhante do relatado na literatura, em termos de frequência de sintomas e quadro clínico, entretanto, com zero óbitos, bem abaixo do relatado em grandes surtos. Atribuímos isso a duas possibilidades: a ação rápida da vigilância com disponibilização da medicação; e a possibilidade de reinfeção para muitos afetados, garantindo uma resistência parcial ao protozoário.

Foi o segundo evento relatado no Brasil onde a bacaba pode ter sido a potencial fonte de infecção, e o primeiro onde o *R. pictipes* foi identificado com o possível vetor envolvido, sendo todos encontrados em área peridomiciliar. Uma semana antes do momento da infecção houve uma grande queimada em área próxima à localidade, o que pode ter obrigado os reservatórios terem ido buscar abrigo mais próximo das moradias. Isso demonstra a importância de encararmos o problema como “Uma Única Saúde” para o controle eficaz deste mal.

Do ponto de vista de acompanhamento de longo prazo, encontramos uma baixa taxa de negatificação sorológica em 4,5 anos. As duas principais hipóteses para isso são: possibilidade de exposição prévia ou exposição contínua após o surto. Não foi possível realizar mais pontos de análise da sorologia nem repetir o exame de PCR para entendermos melhor a cinética destes exames.

Apresentamos todas as barreiras encontradas no manejo de uma situação real em um evento agudo: a vulnerabilidade da população; a dependência de técnicas diagnósticas rudimentares, aliadas ao pouco interesse em desenvolver profissionais de microscopia; a falta de padronização das técnicas de biologia molecular; poucas opções terapêuticas; e a negligência dos governos em realizar os testes básicos e o acompanhamento adequado das pessoas afetadas. Este último acabou sendo o principal fator limitante deste estudo, pois não foi possível realizar exames básicos de avaliação cardiológica em todos os pacientes, sorologias seriadas em tempos mais curtos e outras amostras de biologia molecular.

Para melhorar o tratamento precoce, é necessário investir em melhores técnicas diagnósticas e torná-las amplamente disponíveis. Também demonstramos e propomos que a reação em cadeia da polimerase deva ser incorporada na rotina diagnóstica em todos os casos com parasitologia negativa. Além disso, propomos padronização de investigação e acompanhamento de surtos.

A doença de Chagas aguda é uma ameaça à saúde pública. Embora avanços no controle de vetores tenham sido alcançados, o ciclo peridomiciliar e silvestre permanece ativo, perpetuando assim o parasita na natureza. As populações mais vulneráveis continuam sendo aquelas em extrema pobreza, sem acesso a saneamento básico ou que vivem perto da floresta amazônica. No entanto, como as bebidas classicamente envolvidas na transmissão oral são cada vez mais exportadas para outras regiões, e com a intensa migração humana que vem ocorrendo, surtos em regiões não endêmicas são uma preocupação adicional em relação ao controle da DC. Até que todos olhem para o problema de uma perspectiva de "Uma Só Saúde", nenhuma nação estará a salvo da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- ADLER, S. Darwin's Illness. *Nature*, v. 184, n. 4693, p. 1102–1103, out. 1959.
- ALESSIO, G. D. et al. Innovations in diagnosis and post-therapeutic monitoring of Chagas disease: Simultaneous flow cytometric detection of IgG1 antibodies anti-live amastigote, anti-live trypomastigote, and anti-fixed epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunological Methods*, v. 413, p. 32–44, 1 nov. 2014.
- ARAÚJO, A. et al. Paleoparasitology of Chagas disease: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. suppl 1, p. 9–16, jul. 2009.
- AUFDERHEIDE, A. C. et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 7, p. 2034–2039, 17 fev. 2004.
- BARBOSA-SILVA, A. N. et al. Synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Infestation, colonization, and natural infection by trypanosomatids in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 52, 2019.
- BARROS, F. B.; DE AGUIAR AZEVEDO, P. Common opossum (*Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758): Food and medicine for people in the Amazon. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 10, n. 1, 10 set. 2014.
- BASTOS, C. J. C. et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in Northeastern Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 6, jun. 2010.
- BERN, C. Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 jul. 2015.
- BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and Congenital Chagas Disease. Em: *Advances in Parasitology*. [s.l.] Academic Press, 2011. v. 75p. 19–47.
- BESTETTI, R. B.; CARDINALLI-NETO, A. Dissecting slander and crying for justice: Carlos Chagas and the Nobel Prize of 1921. *International Journal of Cardiology*, v. 168, n. 3, p. 2328–2334, 3 out. 2013.
- BESTETTI, R. B.; MARTINS, C. A.; CARDINALLI-NETO, A. Justice where justice is due: A posthumous Nobel Prize to Carlos Chagas (1879-1934), the discoverer of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *International Journal of Cardiology*, 1 maio 2009.
- BONNEY, K. M. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* Annual Reviews Inc., , 2019.
- BOSCH-NICOLAU, P. et al. Efficacy of three benznidazole dosing strategies for adults living with chronic Chagas disease (MULTIBENZ): an international, randomised,

double-blind, phase 2b trial. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 24, n. 4, p. 386–394, 1 abr. 2024.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Brasília: [s.n.].

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://conitec.gov.br>>.

BRASIL. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>.

BRASIL. Guia de vigilância em saúde: volume 2 [recurso eletrônico]. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente., 2024a. v. 2

BRASIL. Neglected Tropical Diseases in Brazil Morbidity, Mortality and National Response in the Context of the Sustainable Development Goals 2016-2020. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br>>.

BRASIL. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN): doença de Chagas aguda. , set. 2024c.

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. suppl 1, p. 122–135, jul. 2009.

BRUNETO, E. G. et al. Case-fatality from Orally-transmitted Acute Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 72, n. 6, p. 1084–1092, 15 mar. 2021.

BUSS, L. F. et al. Declining antibody levels to *trypanosoma cruzi* correlate with polymerase chain reaction positivity and electrocardiographic changes in a retrospective cohort of untreated Brazilian blood donors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 10, p. 1–14, 1 out. 2020.

CAFFERATA, M. L. et al. Short-course Benznidazole treatment to reduce *Trypanosoma cruzi* parasitic load in women of reproductive age (BETTY): A non-inferiority randomized controlled trial study protocol. *Reproductive Health*, v. 17, n. 1, 24 ago. 2020.

CANDIA-PUMA, M. A. et al. Accuracy of Diagnostic Tests for the Detection of Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *DiagnosticsMultidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, , 1 nov. 2022.

CARLOS PINTO DIAS, J. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 21, p. 1–10, jun. 2016.

CELENTANO, A. M. et al. PGE2 involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Prostaglandins*, v. 49, n. 3, p. 141–153, mar. 1995.

CELENTANO, A. M.; GONZÁLEZ CAPPA, S. M. In vivo macrophage function in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Acta Tropica*, v. 55, n. 3, p. 171–180, nov. 1993.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.

CHAO, C.; LEONE, J. L.; VIGLIANO, C. A. Chagas disease: Historic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* Elsevier B.V., , 1 maio 2020.

CUNHA, M. A. et al. Frequency of *Leishmania* spp. infection among HIV-infected patients living in an urban area in Brazil: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, v. 20, n. 1, 1 dez. 2020.

CUTRIM, F. S. R. F. ESTUDO DOS CASOS AGUDOS DE DOENÇA DE CHAGAS NO MARANHÃO, BRASIL, E SUA RELAÇÃO COM A POBREZA. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, ago. 2017.

DA SILVA, A. A. M. et al. Population-based seroprevalence of SARS-CoV-2 and the herd immunity threshold in Maranhão. *Revista de Saude Publica*, v. 54, p. 1–14, 2020.

DA SILVA, N. N. et al. Epidemic outbreak of Chagas disease probably due to oral contamination. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 10, n. 5, p. 265–76, set. 1968.

DARIO, M. A. et al. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasites and Vectors*, v. 9, n. 1, 31 ago. 2016.

DARWIN, C. Narrative of the surveying voyages of His Majesty's Ships Adventure and Beagle between the years 1826 and 1836, describing their examination of the southern shores of South America, and the Beagle's circumnavigation of the globe. London: Journal and remarks, 1839.

DE ABREU, A. P. et al. Infection susceptibility and vector competence of *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 and *R. pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) for strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) I, II and IV. *Parasites and Vectors*, v. 15, n. 1, 1 dez. 2022.

DE BARROS MOREIRA BELTRÃO, H. et al. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007. *Tropical Doctor*, v. 39, n. 4, p. 231–232, 2009.

DE BONA, E. et al. Autoimmunity in chronic chagas disease: A road of multiple pathways to cardiomyopathy? *Frontiers in Immunology*Frontiers Media S.A., , 6 ago. 2018.

DE CASTRO, A. M. et al. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*, v. 99, n. 4, p. 379–383, set. 2006.

DE CASTRO NETO, A. L.; DA SILVEIRA, J. F.; MORTARA, R. A. Comparative Analysis of Virulence Mechanisms of Trypanosomatids Pathogenic to Humans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*Frontiers Media S.A., , 16 abr. 2021.

DE LANA, M.; MARTINS-FILHO, O. A. Revisiting the posttherapeutic cure criterion in chagas disease: Time for new methods, more questions, doubts, and polemics or time to change old concepts? *BioMed Research International*Hindawi Publishing Corporation, , 2015.

DE NOYA, B. A. et al. Large urban outbreak of orally acquired acute chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *Journal of Infectious Diseases*, v. 201, n. 9, p. 1308–1315, 1 maio 2010.

DE SOUSA, A. S. et al. Chagas disease. *The Lancet*Elsevier B.V., , 13 jan. 2024.

DE SOUZA-LIMA, R. DE C. et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46, n. 4, p. 510–514, 2013.

DIAS, J. C. P. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. SUPPL. 1, p. 11–18, 2007.

DIAS, J. P. et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 3, p. 296–300, jun. 2008.

ECHAVARRÍA, N. G. et al. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Current Problems in Cardiology*Mosby Inc., , 1 mar. 2021.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*W.B. Saunders, , 1 mar. 2019.

EGÜEZ, K. E. et al. Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 4, 3 abr. 2017.

ESPER, H. R. et al. Fatal evolution of acute chagas disease in a child from northern Brazil: Factors that determine poor prognosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 61, 2019.

FABBRO, D. et al. Evaluation of the ELISA-F29 test as an early marker of therapeutic efficacy in adults with chronic chagas disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 55, n. 3, p. 167–172, 2013.

FERREIRA, M. S. et al. Doença de Chagas: tripanossomíase americana. Em: FOCACCIA, R. (Ed.). *Veronesi: Tratado de Infectologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. v. 2p. 1785–1830.

FERREIRA, R. T. B. et al. Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from açai products commercialized in Rio de Janeiro and Pará, Brazil. *Parasites and Vectors*, v. 11, n. 1, 10 abr. 2018.

FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. *Medicina Clínica* Ediciones Doyma, S.L., , 9 fev. 2017.

FRANCO-PAREDES, C. et al. A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America – Public health and travel medicine importance. *Travel Medicine and Infectious Disease* Elsevier USA, , 1 jul. 2020.

GABALDÓN-FIGUEIRA, J. C. et al. Practical diagnostic algorithms for Chagas disease: a focus on low resource settings. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* Taylor and Francis Ltd., , 2023.

GOLD, M. R.; STEVENSON, D.; FRYBACK, D. G. HALYs and QALYs and DALYs, oh my: Similarities and differences in summary measures of population health. *Annual Review of Public Health*, 2002.

GÓMEZ-OCHOA, S. A. et al. Global, Regional, and National Trends of Chagas Disease from 1990 to 2019: Comprehensive Analysis of the Global Burden of Disease Study. *Global Heart*, v. 17, n. 1, 2022.

GONZAGA, B. M. DE S. et al. Clinical trials for Chagas disease: etiological and pathophysiological treatment. *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media SA, , 2023.

GONZÁLEZ, S. et al. Short-course combination treatment for experimental chronic Chagas disease. *Science Translational Medicine*, v. 15, n. 726, 2023.

GONZALEZ-SANZ, M. et al. Chagas Disease in Europe. *Tropical Medicine and Infectious Disease* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 dez. 2023.

HERNÁNDEZ, C. et al. High-Resolution Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* in 2 Large Outbreaks of Acute Chagas Disease in Colombia. *Journal of Infectious Diseases*, v. 214, n. 8, p. 1252–1255, 15 out. 2016.

HIDRON, A. et al. Cardiac involvement with parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, abr. 2010.

HOTEZ, P. J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. *New England Journal of Medicine*, v. 357, n. 10, p. 1018–1027, 6 set. 2007.

JURBERG, J. et al. ATLAS ICONOGRÁFICO DOS TRIATOMÍNEOS DO BRASIL (VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS). Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2014.

KAUFER, A. et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites and Vectors* BioMed Central Ltd., , 8 jun. 2017.

KROPF, S. P.; LACERDA, A. L. DE. Carlos Chagas, um cientista do Brasil = Carlos Chagas, scientist of Brazil [online]. Tradução: Diane Grosklaus Whitty. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2009.

LASCANO, F.; GARCÍA BOURNISSEN, F.; ALTCHÉH, J. Review of pharmacological options for the treatment of Chagas disease. *British Journal of Clinical Pharmacology* John Wiley and Sons Inc, , 1 fev. 2022.

LENT, H. Evolução dos conhecimentos sobre vetores da doença de Chagas 90 anos após sua descoberta. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. suppl 1, p. 89–92, set. 1999.

LEWINSOHN, R. Prophet in his own country: Carlos Chagas and the Nobel Prize. *Perspectives in biology and medicine*, v. 46, n. 4, p. 532–549, 2003.

LEWIS, M. D.; KELLY, J. M. Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. *Trends in Parasitology* Elsevier Ltd, , 1 nov. 2016.

LIDANI, K. C. F. et al. Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. *Journal of Physical Oceanography* American Meteorological Society, , 2019.

LIMA, L. et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Tropica*, v. 151, n. 1, p. 166–177, 3 jun. 2015.

MA. Boletim de queimadas no estado do Maranhão: período de 01 a 15 de janeiro de 2018. [s.l: s.n.].

MALECELA, M. N.; DUCKER, C. A road map for neglected tropical diseases 2021-2030. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* Oxford University Press, , 1 fev. 2021.

MARTÍN-ESCOLANO, J. et al. An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. *ACS Infectious Diseases* American Chemical Society, , 10 jun. 2022.

MARTINS-FILHO, O. A. et al. Double-blind study to evaluate flow cytometry analysis of anti-live trypomastigote antibodies for monitoring treatment efficacy in cases of human Chagas' disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 5, p. 1107–1113, set. 2002.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Tropica*, fev. 2014.

MARTINS-MELO, F. R.; CASTRO, M. C.; WERNECK, G. L. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000–2019. *Acta Tropica*, v. 220, 1 ago. 2021.

MELO, M. F. et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasites and Vectors*, v. 8, n. 1, 2015.

MOLINA, I. et al. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 10, p. 6125–6131, 1 out. 2015.

MOREIRA, C. H. V. et al. Parasitemia and antibody response to benznidazole treatment in a cohort of patients with chronic Chagas disease. *Frontiers in Parasitology*, v. 2, 5 set. 2023a.

MOREIRA, O. C. et al. Validation of the NAT Chagas IVD Kit for the Detection and Quantification of *Trypanosoma cruzi* in Blood Samples of Patients with Chagas Disease. *Life*, v. 13, n. 6, 1 jun. 2023b.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 1 out. 2015.

NOGUEIRA, S. S. et al. Monotherapy and combination chemotherapy for Chagas disease treatment: a systematic review of clinical efficacy and safety based on randomized controlled trials. *Parasitology* Cambridge University Press, , 12 nov. 2022.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: Adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research*, mar. 2009.

NOYA, B. A. DE et al. The performance of laboratory tests in the management of a large outbreak of orally transmitted Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 7, p. 893–898, nov. 2012.

ORTEGA ZAMORA, Y. et al. Chagas disease immunogenetics: elusive markers of disease progression. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* Taylor and Francis Ltd, , 4 maio 2017.

PAHO. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. Washington, DC: Pan American Health Organization, 2019.

PAIXÃO, D. DA S. et al. Mapping the Silent Threat: A Comprehensive Analysis of Chagas Disease Occurrence in Riverside Communities in the Western Amazon. *Pathogens*, v. 13, n. 2, 1 fev. 2024.

PASCUAL-VÁZQUEZ, G. et al. Molecular diagnosis of Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Infectious Diseases of Poverty* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2023.

PEREIRA, M. H. et al. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 11, p. 516–520, nov. 2006.

PEREZ, F. et al. The use of rapid diagnostic tests for chronic Chagas disease: An expert meeting report. *PLoS neglected tropical diseases*, 1 ago. 2024.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. *The Lancet* Lancet Publishing Group, , 6 jan. 2018.

PETERSON, J. K. et al. First Report of Chagas Disease Vector Species *Triatoma sanguisuga* (Hemiptera: Reduviidae) Infected with *Trypanosoma cruzi* in Delaware. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 110, n. 5, p. 925–929, 2024.

PORTO, A. P. M. et al. Healthcare-Associated infections on the intensive care unit in 21 Brazilian hospitals during the early months of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: An ecological study. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 44, n. 2, p. 284–290, 18 fev. 2023.

QUEIROGA, T. B. D. et al. Virulence of *Trypanosoma cruzi* Strains Is Related to the Differential Expression of Innate Immune Receptors in the Heart. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 15 jul. 2021.

RAMOS NASCIMENTO, B. et al. Prevalence of clinical forms of Chagas disease: a systematic review and meta-analysis – data from the RAISE study. *The Lancet Regional Health - Americas*, v. 30, 1 fev. 2024.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Chronic chagas cardiomyopathy: A review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* Fundacao Oswaldo Cruz, , 1 mar. 2017.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *The Lancet* Elsevier B.V., , 2010.

RIVERO, R. et al. ELISA F29 –A therapeutic efficacy biomarker in Chagas disease: Evaluation in pediatric patients treated with nifurtimox and followed for 4 years post-treatment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 17, n. 6 June, 1 jun. 2023.

RIVERO, R. et al. Comparative evaluation of four rapid diagnostic tests that detect human *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies to support diagnosis of Chagas Disease in urban population of Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 18, n. 3, 1 mar. 2024.

ROBERTSON, L. J. et al. The importance of estimating the burden of disease from foodborne transmission of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* Public Library of Science, , 1 fev. 2024.

SANTANA, R. A. G. et al. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, v. 25, n. 1, p. 132–135, 1 jan. 2019a.

SANTANA, R. A. G. et al. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, v. 25, n. 1, p. 132–135, 1 jan. 2019b.

SANTOS, E. DE S. et al. Immunomodulation for the Treatment of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: A New Approach to an Old Enemy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* Frontiers Media S.A., , 12 nov. 2021.

SCHIJMAN, A. G. et al. Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic chagas disease: From field to laboratory. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* Fundacao Oswaldo Cruz, , 2021.

SEBRAE. Boas Práticas para os Batedores de Açaí. Brasília: [s.n.].

SEIRINGER, P. et al. Comparison of four PCR methods for efficient detection of *Trypanosoma cruzi* in routine diagnostics. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 88, n. 3, p. 225–232, 1 jul. 2017.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 33, n. 5, p. 351–357, out. 1991.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, v. 54, n. 6, p. 845–852, 15 mar. 2012.

SILVA, A. R. DA et al. Primeiros casos agudos autóctones da doença de Chagas no Maranhão e inquérito soro-epidemiológico da população. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 18, n. 4, p. 269–270, dez. 1985.

SIMÕES-NETO, E. A. et al. Oral Chagas disease outbreak by bacaba juice ingestion: A century after Carlos Chagas' discovery, the disease is still hard to manage. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 18, n. 9, p. e0012225, 1 set. 2024.

SUÁREZ, C. et al. Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas. *Research and Reports in Tropical Medicine*, v. Volume 13, p. 25–40, jul. 2022.

VALENTE, S. A. DA S. et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, n. 3, p. 291–297, mar. 2009a.

VALENTE, S. A. DA S. et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, n. 3, p. 291–297, mar. 2009b.

VARGAS, A. et al. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. *Cadernos de Saude Publica*, v. 34, n. 1, 2018.

VELÁSQUEZ-ORTIZ, N. et al. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*: Geographical and biological distribution in the Americas. *Scientific Data*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2022.

WALDECK, B.; SCHAUB, G. A. “Natural infections” with *Trypanosoma cruzi* via the skin of mice: size of mouthparts of vectors and numbers of invading parasites. *Parasitology Research*, v. 121, n. 7, p. 2033–2041, 1 jul. 2022.

WENDLING, A. P. B. et al. The use of IgG antibodies in conventional and non-conventional immunodiagnostic tests for early prognosis after treatment of Chagas disease. *Journal of Immunological Methods*, v. 370, n. 1–2, p. 24–34, 29 jul. 2011.

WHO. Avanços para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas: Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas. Geneva: World Health Organization, 2012.

WHO. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva: World Health Organization, 2020.

WHO. Global report on neglected tropical diseases 2024. Geneva: World Health Organization, 2024a.

WHO. World Chagas Disease Day 2024 pagina.

WHO; PAHO. 49th DIRECTING COUNCIL 61st SESSION OF THE REGIONAL COMMITTEE. Washington, DC: [s.n.]. Disponível em: <https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1640:2009-49th-directing-council&Itemid=1425&lang=en#gsc.tab=0>. Acesso em: 15 set. 2024.

WINCKER, P. et al. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 51, n. 6, p. 771–777, 1994.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, mar. 2012.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica* Elsevier B.V., , 1 ago. 2018.

ZINGALES, B.; MACEDO, A. M. Fifteen Years after the Definition of *Trypanosoma cruzi* DTUs: What Have We Learned? *Life* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 dez. 2023.

APÊNDICE A – Publicação dos dados do projeto do doutorado

Periódico PLOS Neglected Tropical Diseases

Qualis A, Fator de impacto 3.4

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

RESEARCH ARTICLE

Oral Chagas disease outbreak by bacaba juice ingestion: A century after Carlos Chagas' discovery, the disease is still hard to manage

Eudes Alves Simões-Neto^{1*}, Daniel Wagner de Castro Lima Santos^{2,3}, Maria Rosa Quaresma Bomfim⁴, Jackson Maurício Lopes Costa⁵, Amanda Ferreira Simões⁶, Lucas Dias Vasconcelos¹, Domingos Carvalho Sodré⁶, Ana Cleide Mineu Costa⁶, Samuel Vieira Rodrigues Dumont⁵, Bruna de Oliveira de Melo⁴, Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo¹

1 Health Sciences Graduate Program, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, **2** Presidente Dutra University Hospital (HU-UPD), Brazilian Company of Hospital Services (EBSERH), Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil, **3** IDOR, Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino, **4** Ceuma University (UNICEUMA), São Luís, Brazil, **5** State Health Department of Maranhão (SES/MA), São Luís, Brazil, **6** Brasília University Hospital (HUB), Brazilian Company of Hospital Services (EBSERH), Brasília University (UnB), Brasília, Brazil

* eudesimoes@gmail.com, eudes.simoes@ufma.br



OPEN ACCESS

Citation: Simões-Neto EA, Santos DWdCL, Bomfim MRQ, Costa JML, Simões AF, Vasconcelos LD, et al. (2024) Oral Chagas disease outbreak by bacaba juice ingestion: A century after Carlos Chagas' discovery, the disease is still hard to manage. *PLoS Negl Trop Dis* 18(9): e0012225. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012225>

Editor: Andrés F. Henao-Martínez, University of Colorado Anschutz Medical Campus: University of Colorado - Anschutz Medical Campus, UNITED STATES OF AMERICA

Received: May 19, 2024

Accepted: July 24, 2024

Published: September 18, 2024

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012225>

Copyright: © 2024 Simões-Neto et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Background

Orally transmitted acute Chagas disease (ACD) primarily affects low-visibility and low-income individuals in tropical and subtropical zones. Managing ACD remains challenging even after more than 100 years of its discovery. Its spread to non-endemic areas has made it a global health issue. The aim of this work is to demonstrate the difficulties encountered in handling a real-life situation.

Methodology and findings

This report examines an outbreak of 39 cases of ACD due to oral transmission by bacaba juice ingestion that occurred in Pedro do Rosário, Maranhão, Brazil. A clinical and epidemiological investigation, including an entomological search, was conducted. Diagnosis criteria included positive peripheral blood smear (PBS), seroconversion of IgG, and a two-fold increase in IgG titer (laboratory criteria); and clinical findings, epidemiological exposure, and at least one positive IgG test (clinical-epidemiological criteria). In-house conventional polymerase chain reaction (PCR) was performed on 33 samples. All patients were treated with benznidazole. After 4.5 years, IgG levels were reassessed in 26 individuals. The mean age was 33.6 years, with no gender difference. The mean incubation period was 13.8 days, and the mean between symptom onset and treatment was 16.6 days. The most common symptoms were fever and lymphadenopathy (90%). Diagnostic success rates were 66.6% (laboratory criteria), 23% (clinical-epidemiological criteria), and 10.2% (high clinical suspicion despite negative tests). Test positivity rates were 69.7% (PBS), 91.4% (serology), and

Data Availability Statement: All relevant data are in the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

100% (PCR). There were no deaths. Serological cure was achieved in 34.6% of cases, and IgG titers decreased in 15.3%.

Conclusions and significance

We encountered several barriers in managing ACD, including population vulnerability, reliance on outdated diagnostic techniques, lack of standardized molecular biology methods, and limited therapeutic options. This report underscores the importance of rapid surveillance and early treatment to prevent fatalities. We recommend the standardization of conventional PCR in diagnostic routines.

Author summary

In this study we present an outbreak of orally transmitted acute Chagas disease (ACD), a neglected tropical disease. The source of transmission was bacaba juice served at a celebration held in a quilombola community and 39 individuals were affected. The focus of this study was clinical-epidemiological investigation and diagnostic tools. There were no deaths due to this event, probably because of the quick action of the surveillance team and the early start of treatment. We show all the difficulties facing a real-life situation (vulnerability of population affected, weaknesses regarding good food safety practices and obstacles to following what guidelines recommend), discuss the performance and feasibility of the diagnostic method used and address the global threat that Chagas disease may pose. Furthermore, we propose that the polymerase chain reaction should become standardized in diagnosing acute disease, given that this was the only method with 100% positivity, even among patients whose other tests were all negative.

1. Introduction

Chagas disease (CD) is a chronic systemic anthroponosis in the Americas caused by *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), a hemoflagellate intracellular parasite discovered in 1909 [1,2]. American trypanosomiasis is classified by the World Health Organization (WHO) as one of the 20 neglected tropical diseases (NTDs) and it affects low-visibility and low-income individuals and populations in developing countries, mainly in tropical and subtropical zones [2]. Furthermore, its status as a NTD means that controlling or eradicating it by applying public health strategies remains possible, even though it has been neglected by laboratories, pharmaceutical companies and local governments.

Even 115 years after the little girl Berenice and the publication [4,5,6,7] of Carlos Chagas' work, in which he describes the etiological agent, some domestic and wild reservoirs, the vector, the life cycle, clinical manifestations and complications of the disease, CD continues to be endemic in Latin American countries, especially in Brazil, Argentina, Mexico, Bolivia and Chile [1,3]. Although the prevalence rate per 100,000 population decreased in many countries between 1990 and 2019, in Brazil an increase of 12.8% in the estimated number of cases was observed over this period [8]. The high numbers of disability-adjusted life-years (DALYs), years of life lost (YLLs) and years lived with a disability (YLDs) due to CD worldwide are still challenging. Curiously, a decrease in DALYs was observed in Brazil over the same period,

although a representative magnitude for society remained, as Brazil continues to be the country with the highest estimated number of cases, and number of deaths from the disease [8,9].

Over the past few decades, enhanced vector control programs and mandatory screening for blood transfusions have decreased the burden of this disease in Latin America [3]. However, while the typical vectorial transmission route has become controlled, the other forms of acquiring the disease have represented a challenge over the last 20 years, especially vertical, oral and post-transplant. Food-borne transmission has gained great importance, as it can cause outbreaks secondary to contamination of food and beverages and because of its pathophysiology and clinical features [10]. The vector most frequently associated with this route is *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Triatominae), and transmission through this route occurs when whole triatomines or their feces carrying metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi* taint juices made from sugar cane, bacaba, açai or palm wine. Transmission through ingestion of infected wild-animal meats also occurs [12,10,11].

Currently, oral infection with *T. cruzi* is the most important transmission route in Brazil. Several outbreaks have especially been documented in the Amazon region (states of Pará and Amazonas), and in some states in the northeastern and southern regions. Furthermore, the trend over the years has been increasing [12]. This oral transmission represents a major challenge for implementation of resolution CD49.R19, created by the 49th Directing Council of PAHO in 2009, which promotes the elimination or reduction of neglected diseases and other related poverty diseases, including Chagas disease in all its forms of presentation [13].

Regarding diagnosis, there are still major challenges ahead. Some tools standardized through international guidelines are difficult to use and require several samples, and many of them are archaic. For chronic Chagas disease (CCD), use of two different serological tests continues to be recommended (enzyme-linked immunosorbent assay–ELISA, hemagglutination inhibition assay–HAI, or indirect immunofluorescence–IIF). In limited-resource settings or difficult-to-access areas, a single ELISA test may be considered, but requires confirmation with another test prior to starting treatment [14]. Over recent years, some studies have presented encouraging results regarding the performance of rapid tests (immunochromatographic) for diagnosing CCD [15,16]. However, for acute Chagas disease (ACD), we continue to rely on microscopy (with variable sensitivity) and conventional immunological tests, both often requiring several samples. To date, only one molecular test kit has been approved for use in Brazil, the NAT Chagas Kit, developed by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) in partnership with the Institute of Molecular Biology of Paraná (IBMP), and its use is still far from being universal [17], and these techniques are restricted to surveillance laboratories and research centers [18]. There is also currently no point-of-care test for diagnosing ACD.

The treatment options for Chagas disease are even more restricted. The two trypanocide drugs available, benznidazole and nifurtimox, have been used for over 50 years. However, due to the long-term treatment (60 to 90 days) and high frequency of side effects (about 40%), there is a high dropout rate [19,20]. Some initiatives in this field deserve to be highlighted, such as Drugs for Neglected Disease (DNDi), which helped to develop the first formulation of benznidazole for pediatrics, in addition to promoting studies with lower doses and shorter treatment time [21,22]. However, many more actions are necessary in order to achieve the greater objective: a highly effective medication, with low cost, shorter treatment time and fewer side effects.

The present study evaluates the clinical-epidemiological characteristics and diagnostic aspects of an autochthonous outbreak of ACD due to oral transmission that occurred in the state of Maranhão, Brazil, which had previously not been considered an area of high prevalence or high risk of disease transmission. We have described the epidemiological surveillance and diagnostic methods, including molecular tools, and discussed the genetic analysis of *T.*

cruzi. These data have allowed us to better understand the risks associated with transmission, as well as the diagnostic and therapeutic challenges involved in the standard treatment available in Brazil.

2. Methods

2.1. Ethical statements

Formal written consent was obtained from all the patients and the parent/guardian in case of children. Ethics approval for this study was obtained from the University Hospital Research Ethics Committee of the Federal University of Maranhão, through protocol number 4.357.642, through submission through the 'Plataforma Brasil'.

This was a prospective cohort study in which patients with ACD from an outbreak due to oral transmission were followed up for 4.5 years.

2.2. Location

The outbreak occurred in Boa Fé village, a quilombo community, which is a type of community originally founded by fugitive slaves of African origin, located in the municipality of Pedro do Rosário (latitude -2.97727, longitude -45.3464, 2°58'38" south, 45°20'47" west), state of Maranhão, northeastern Brazil, in the pre-Amazon region, with a tropical climate.

2.3. Population evaluated and period

The study involved 39 patients with ACD from the same outbreak. The information relates to the period during which the outbreak occurred (2018) and another period 4.5 years later (2022). It was not possible to do other time point analysis due to the municipalities and state resource limitations.

2.4. Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria were acceptance to participate in the study, signing of the consent form, and at least one of the following: presence of symptoms; positive direct microscopic examination of peripheral blood with *T. cruzi*; seroconversion of IgG; two times increase in IgG titer with at least 15 days interval. The exclusion criterion was refusal to participate in the study.

2.5. Clinical evaluation

The following were investigated: incubation period, time taken to initiate the therapy, duration of therapy and clinical findings (fever, asthenia, chills, myalgia, facial edema, dyspnea, headache, cough, abdominal pain, lower limbs edema, thoracic pain, diarrhea and inoculation chagoma).

2.6. Diagnostic criteria and tools

To define ACD cases, diagnostic criteria already established in the literature and guidelines were used [15]: (a) laboratory criteria (at least one of the following tests: positive direct microscopic examination of peripheral blood smear, seroconversion of IgG or 2x increase in IgG titer with at least 15 days interval); (b) clinical-epidemiological criteria (clinical findings, epidemiological exposure and at least one positive IgG finding). The direct microscopic examination consisted of use of the technique of blood smears from peripheral blood with Giemsa staining from Merck; and the serological tests used were ELISA from Bioclin, IIF from Bio Manguinhos and HAI from Wama Diagnostica. It was not possible to perform the IgM test

due to lack of resources and the inherent difficulty in the technique. Additionally, *in house* conventional PCR was performed on 33 of the 39 stored samples. A full description of the PCR (S1 Text) including electrophoresis (S1 Fig), the phylogenetic tree (S2 Fig) and the blood smear techniques (S2 Text) is presented.

2.7. Epidemiological surveillance

An investigative process was conducted, consisting of interviews among the local population, observation of the production process of the drink involved in the outbreak and distribution of triatomine information stations (Portuguese acronym PIT) for six months. PITs are epidemiological surveillance strategies to monitor vectors. They consist of boxes containing visual information about triatomine species that are distributed across the localities of concern. These boxes are disseminated among the population. Whenever a resident finds a suspicious arthropod, they deposit it in a PIT and report this finding to surveillance workers, who, in turn, analyze the insect and look for *T. cruzi* in its feces.

2.8. Treatment

All 39 patients were treated with benznidazole: adults with 5 mg/kg/day (maximum of 300 mg/day) and children with 5–10 mg/kg/day, for at least 30 days.

2.9. Long term follow-up

After an interval of 4.5 years, serological tests (ELISA and IIF) were performed on 26 patients. The others were lost to follow-up because they had changed their place of residence to another state. It was not possible other time point analysis due to the municipality's resource limitations.

[Fig 1](#) show the study selection and follow-up.

3. Results

3.1. Outbreak report

On February 15, 2018, a 69-year-old woman from Boa Fé village, in Pedro do Rosário, Maranhão, Brazil, who had previously been admitted to and discharged from a municipal hospital twice, with two negative malaria blood smears, came to the Regional Epidemiological Surveillance Center of Pinheiro, Maranhão, Brazil, to undergo a third malaria blood smear. The patient had an 11-day history of abdominal pain, myalgia, asthenia, chills and fever in the late afternoon. The first two tests, previously found to be negative for malaria, were reviewed. Both of them tested positive for trypomastigote forms of *T. cruzi*, thus confirming that the patient had ACD (Fig 2). There was no need to perform the third sample. She was treated with 300 mg/day of benznidazole and became asymptomatic in less than a week.

An epidemiological investigation found that other people living in the same village also had similar symptoms. Moreover, they all had attended a celebration on January 21 (three weeks earlier) at which bacaba juice was served, which was the likely transmission route. Within two weeks after the first case, 85 people were evaluated looking for symptoms and performing serology and direct parasitological examination. An outbreak of 39 cases of ACD was diagnosed and treatment was started for all these individuals.

3.2. Epidemiological investigation

An investigation team was deployed to the area. Boa Fé village is a quilombo community, which is a type of community originally founded by fugitive slaves of African origin, located in

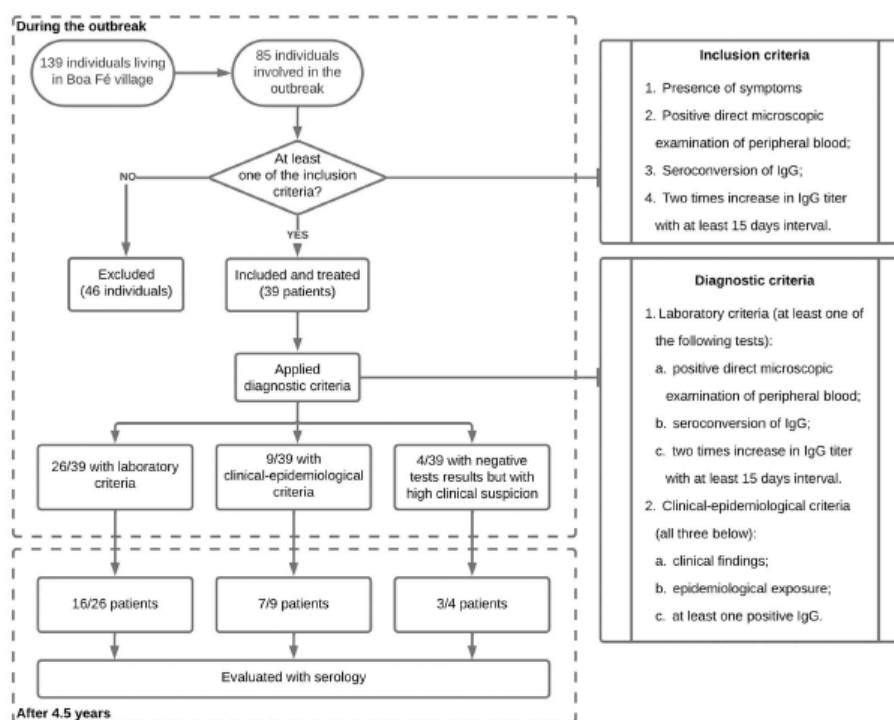


Fig 1. Study selection, diagnostic criteria, and follow-up of the population affected by the outbreak of acute Chagas disease in Pedro do Rosário, Maranhão, Brazil.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012225.g001>

the municipality of Pedro do Rosário (latitude -2.97727, longitude -45.3464, 2°58'38" south, 45°20'47" west), which is 178 kilometers from the capital São Luís, state of Maranhão, northeastern Brazil (Fig 3), in the pre-Amazon region, with a tropical climate. There was no paved road access. It is close to an environmental protection area (EPA), the Baixada Maranhense EPA, which is a Ramsar site.

The residents of this village live in extreme poverty, in mud houses (Fig 4) with no basic sanitation (no sewage disposal system and no treated water) and with few healthcare resources. The area is inhabited by several species that act as reservoirs of *T. cruzi*, but the one most likely involved in this outbreak was the "mucura", a marsupial species of opossum from the Didelphidae family [23], which has the habit of living or hiding in the palm tree canopy. Triatomines, which feed on the blood of these mammals, also make their home in the palm canopy. When the fruit is extracted and processed, the insects may be accidentally crushed and those infected by *T. cruzi* end up contaminating the beverage. The most frequently species in the state are from genera *Pangystrogylus* and *Rhodnius* [24]. However, the data is old, as routine monitoring is not being performed by the municipalities and the state.

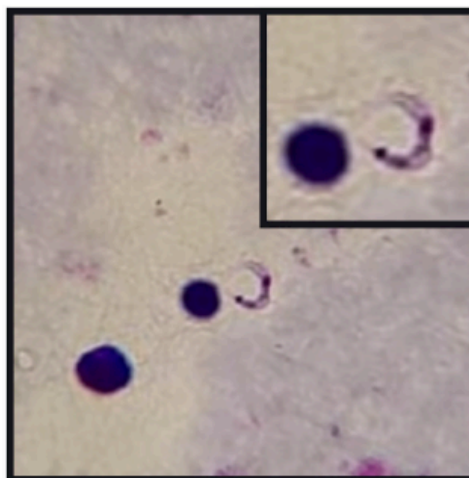


Fig 2. Trypomastigote form of *T. cruzi* (arrow) in a peripheral blood smear stained using the Giemsa stain technique, from the index case (optical microscopy, 1000x magnification).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012225.g002>

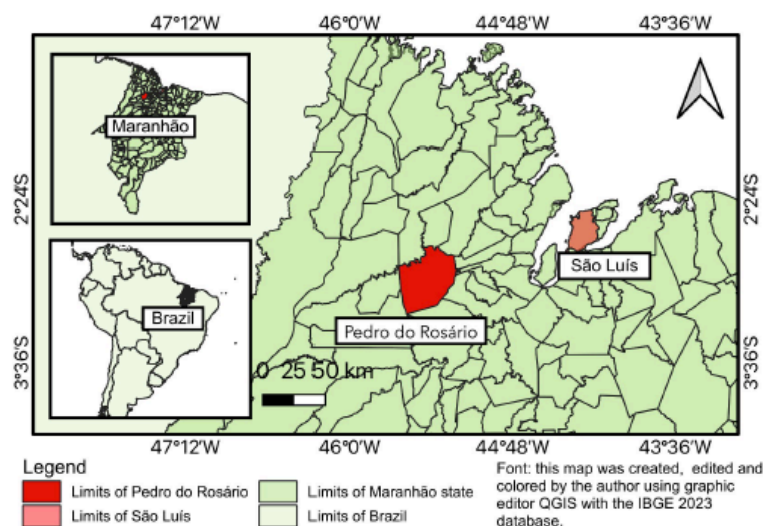


Fig 3. Map of the geographic location of Pedro do Rosário, state of Maranhão, northeastern Brazil. Base layer of the map (open data source): <https://portaldemapas.ibge.gov.br/portal.php#homepage>. Terms of use of IBGE data: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101675.pdf>.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012225.g003>



Fig 4. Typical house in the Boa Fé village (made of mud).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012225.g004>

Oenocarpus bacaba ("bacaba") is a palm tree native to the Amazon and its fruit resembles that of *Euterpe edulis* ("juçara" or "açai"). It can reach up to 20 meters in height and 20 to 25 centimeters in diameter (Fig 5). Its fruit is widely consumed in the region and is often the only source of food for the local population. It is a tradition for this community to hold a celebration every year during the bacaba seasonal period, which occurs between December and April.

The juice production process is completely artisanal and does not follow good practices. The bacaba bunch is placed in a plastic bag on the ground where the fruits are removed. The fruits are then placed in a bucket of untreated water where it remains for a few minutes to remove excess straw and wood. The water is then removed, and the fruits are crushed by hand to extract the juice. The liquid is then passed through a sieve to remove the seeds and skins of the fruit. Finally, the liquid is slightly warmed over a wood fire, but not at high temperature. After cooling, the juice is served.

For the entomological investigation, triatomine information stations (Portuguese acronym PIT) were distributed throughout the community and kept there for six months. Through their use, 25 specimens of *Rhodnius pictipes* (Stal, 1872) (Hemiptera, Reduviidae) and two of *R. robustus* (Larrousse, 1927) were found, all in peridomestic areas, with an infection rate of 33.3% (Table 1). No specimens of any species were found inside the houses.

3.3. Demographic, clinical and laboratory characteristics

The demographic and clinical characteristics of the outbreak are summarized in Table 2. The patients' mean age was 33.6 years (ranging from 10 months to 78 years). There was no difference in gender distribution (20 women and 19 men). The mean incubation period was 13.8 days (ranging from 2 to 28 days). The mean length of time between symptom onset and treatment was 16.6 days (ranging from 6 to 54 days). The most frequent symptoms were fever and lymphadenopathy (90%; 35/39), asthenia (56%; 22/39), chills (51%; 20/39), myalgia (48%; 18/39), facial edema and dyspnea (38%; 15/39) and headache and cough (31%; 12/39). There were no patients with Romaña's sign.

Out of the 39 cases, 66.6% (26/39) were diagnosed through laboratory criteria and 23% (9/39) through clinical-epidemiological criteria, while 10.2% (4/39) had negative tests but were considered to be cases of ACD due to high clinical suspicion, as shown in Fig 1. We performed one peripheral blood smear, and also two sequential serological evaluations 50 days apart. The positivity rates of the tests were as follows: peripheral blood smear in 69.7% (23/33) of the cases; first serological sample in 66.6% (26/39) of the cases, and seroconversion OR 2x increase



Fig 5. *Oenocarpus bacaba* palm tree (A) and fruit (B).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012225.g005>

in IgG titer in 17.7% (6/35) of the cases. The overall positivity of the serological tests was 91.4% (32/35). Sequential samples were not collected on time in the cases of four patients.

All 33 samples (100%) amplified through PCR and sequencing with the specific primers allowed us to identify *T. cruzi*. These included nine of the thirteen patients diagnosed through clinical-epidemiological criteria and all four patients for whom all other test results were negative. The sequences from these samples have been deposited in GenBank under the following accession numbers: ON037202 to ON037234. Alignment of these sequences with *T. cruzi* sequences previously deposited in GenBank showed a genetic similarity ranging from 94.8 to

Table 1. Quantities of triatomines captured and *T. cruzi* infection rate between March and October 2018, Pedro do Rosário, Maranhão, Brazil.

Months	Triatomines captured (n)	Triatomines positive for <i>T. cruzi</i> (n / %)
March	3	0 / 0
April	5	1 / 20%
May	3	1 / 33.3%
June	2	2 / 100%
September	6	2 / 33.3%
October	8	3 / 37.5%
Total	27	9 / 33.3%

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012225.t001>

100.0% with samples from the state of Pará, which is located in the northern region of Brazil. Through phylogenetic analysis it was possible to ascertain the evolutionary relationships between our sequences and those from GenBank, as detailed in [S2 Fig](#).

All 39 patients were treated with benznidazole: adults with 5 mg/kg/day (maximum of 300 mg/day) and children with 5–10 mg/kg/day, for 60 days. Only two patients withdrew from the treatment before the end of the schedule, but they completed at least 30 days of treatment. One of them had to be hospitalized due to a drug reaction consisting of eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome, which was resolved with corticosteroids and antihistamines. There were no deaths due to this outbreak. The demographic, clinical characteristics, diagnostic criteria, and test results of each patient of the outbreak are summarized in [S1 Table](#).

After an interval of 4.5 years, ELISA and IIF IgG were performed on 26 individuals, which showed that serological cure (negative tests) had been achieved in 34.6% of the cases (9/26), while decreased IgG titers were found in 15.3% of the cases (4/26). For 26.9% of cases (7/26) there was an increase in IgG titers and 15.3% of cases (4/26) maintained the same level. In 7.6% of cases (2/26) there were seroconversion. The other patients were lost to follow-up because they had changed their place of residence to another state.

Table 2. Demographic and clinical characteristic of an outbreak of 39 cases of acute Chagas Disease due to oral transmission in Pedro do Rosário, Maranhão, Brazil.

Variable	Result
Gender (M:F)	20:19
Mean age (y)	33.6 (10m–78y)
Mean incubation period (d)	13.8 (2–28)
Mean length of time between symptom onset and treatment (d)	16.6 (6–54)
Most frequent symptoms (%)	fever and lymphadenopathy (90%; 35); asthenia (56%; 22); chills (51%; 20); myalgia (48%; 18); facial edema (38%; 15); dyspnea (38%; 15); headache (31%; 12); cough (31%; 12); abdominal pain (28%; 11); thoracic pain (8%; 3); diarrhea (8%; 3).

M: male; F: female; y: years; m: months; d: days; %: percentual

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012225.t002>

After this outbreak, a series of training sessions were conducted among the municipality's healthcare team and communities, with the aim of raising awareness of the importance of Chagas disease and training in safe processing, in accordance with national guides [25]. Given that the foods involved in its transmission are the only source of survival for most people in the region, stopping eating them is not an option. The population was trained to produce this food in a safer way, while maintaining the artisanal process, but this did not constitute a guidance policy extended to the entire state. The description of this protocol is included in [S3 Text](#).

4. Discussion

Here, we present an epidemic outbreak of acute Chagas disease due to oral transmission in a high-vulnerability population in the state of Maranhão, Brazil. It was the largest reported outbreak to date in this state.

In 2021, the Human Development Index (HDI) of the state of Maranhão was 0.676, the lowest in Brazil. Hunger, malnutrition, social exclusion, and deficient basic sanitation are a hallmark of the state. More than 50% of the population lives on a per capita income of less than US\$81 per month. Only 56.5% of the population of Maranhão has access to a piped water system and 43.5% do not have access to drinkable water [26].

All these associated factors have given rise to an explosion of endemic diseases in this state, including increased numbers of cases and outbreaks of ACD. Until 2010, cases in Maranhão were recorded only through the classic vectorial route in a predominantly wild environment [12]. Most cases of orally transmitted ACD were imported from the state of Pará. Over the last 15 years an increase in autochthonous cases through this route has been reported, making ACD an emerging disease [12]. Cutrim (2017) reported that there was a significant increase in orally transmitted ACD from 2010 onwards [27]. The outbreak described here was the largest in the state, which emphasized that the actions of the public healthcare system must focus on promoting improvements in basic sanitation, in addition to developing a safe food production program for the population. At the time of the present study, there was no record of public policies that included safe production of these products by the population.

Orally transmitted Chagas disease has particularities that are worth mentioning. In contrast to vector-borne transmission, the higher parasite load after oral ingestion makes controlling the disease more difficult for the immune system [28]. This is demonstrated through higher parasitemia and increased tissue invasion [2]. It may lead to a shorter incubation period, [29,30], early cardiac involvement and increased severity [31,32,33]. However, the clinical manifestations may be nonspecific, which makes diagnosis a real challenge for clinicians, given that ACD can be confused with other acute febrile illnesses, such as leptospirosis, visceral leishmaniasis, malaria, enteric fever, rickettsiosis, and some arboviruses [10].

The possibility of orally acquired CD should always be suspected in situations in which an epidemiological link exists, such as in endemic areas or with more than one simultaneous case with ingestion of suspected food. A good clinical clue is the presence of fever for more than a week, associated with facial edema or bipalpebral edema and lymphadenopathy in patients with an epidemiological link. High frequency of fever and lymphadenopathy (90%) and low frequency of facial edema (38%) were found in the present study, which is in line with other reports [34,35,36].

The difficulty in establishing the diagnosis in real life was demonstrated here. The tools available that are recommended in the guidelines are low in efficiency, as they require several visits and involve complex and often rudimentary processes. The gold standard in diagnosing ACD is direct parasitological methods, but these have variable sensitivity, as they are operator-

dependent and need to be repeated on multiple samples [14, 37]. Therefore, the best recommendation is to combine methods [14].

In infectious disease, identification of the agent is often the gold standard. In Chagas disease, there are direct and indirect methods. Xenodiagnosis and blood culture are among the indirect methods. Xenodiagnosis is an old but sophisticated procedure. It was the first method used when CD was discovered. Laboratory-reared vectors are induced to bite patients, and 30 to 60 days later, their excreta are analyzed to search for the parasite. There are clearly some disadvantages in this technique, such as the time and resources required to perform the procedure, as well as the risks associated with handling insect vectors. Hemoculture is another indirect method, in which the examination should be performed monthly for as long as six months. However, both xenodiagnosis and hemoculture have low sensitivity [38,39] (around 20%) and are best suited for the chronic phase of the disease [14,37].

The most sensitive of the direct parasitological methods consists of examination of fresh blood in association with concentration methods [14,37,40] (Strout, buffy coat or microhematocrit). However, considering that the region of the present study is endemic for malaria, the blood smear technique is the tool that is most available, and it is easily performed by some laboratory technicians in Maranhão. Furthermore, it is recommended that the parasitological test should be repeated every 12–24 hours while the clinical condition persists, until the parasite is found or another diagnosis is established [14,37,40]. Unfortunately, due to the logistical difficulty in collecting samples in remote areas, it was not possible to repeat this test in a timely manner. Also, there has been a shortage of qualified technicians to perform good-quality microscopy over the years, thus posing a threat to making diagnoses of ACD. In the present study, the peripheral blood smear technique was used and positivity of 69.7% was found in a single-sample analysis, which was higher than had been found in other reports [41]. Nonetheless, variable sensitivity has been reported in the literature, with the best results found in reference laboratories [34,42,43].

In diagnosing ACD, serological tests are considered to be the tool with the greatest sensitivity and specificity, through detecting IgG seroconversion or an IgG titer that more than doubles over a minimum interval of 2 weeks [17]. However, this is not the most recommended tool, given the time required for achieving confirmation [39,40]. Moreover, use of IgM has serious limitations in ACD: there are no commercial kits; positive controls are hard to find; it remains positive for several years in chronic patients; and it might give false positives with rheumatoid factor and in cases of other infectious diseases such as leishmaniasis [44]. In the outbreak of the present report, two sequential serological tests were performed, with an interval of 50 days between them. ELISA and IIF were used for the first sample and ELISA and HAI for the subsequent sample. We found positivity of 66.6% (26/39) in the first sample and 17.7% seroconversion (6/35). Four samples were lost in sequential analysis. The overall positivity of the serological tests was 91.4% (32/35). This result was in line with those of several other publications [38,45,46]. It was not possible to perform IgM, due to the limitations mentioned above, and the reference laboratory did not have the resources to do this test. If this test had been performed, we could have found higher values, but with conflicting results.

Regarding the cure criteria, some remarks must be made. There are no gold standard serological tests or biomarkers that define situations of CD cure. Molecular biology analyses and non-conventional serological tests aimed at specific forms of *Trypanosoma* like anti-live trypomastigote (FC-ALTA), anti-fixed epimastigote (FC-AFEA) and anti-three evolutive forms (FC-ATE) or antigen tests (ELISA-F29) have been tested with inconclusive results [46,47,48,49,50]. Therefore, reversion to negative seen through conventional serological tests is considered to be the most reliable indicator of successful cure [51,52], and this is associated with the absence of parasitemia [53]. In long-term follow-up, after 54 months (4.5 years), we

were able to perform serological tests (ELISA and IIF) on 26 individuals and found serological cure (negative tests) in 34.6% (9/26) and decreased IgG titers in 15.3% (4/26). The other patients were lost to follow-up because they had changed their place of residence to another state. These rates were lower than other reports on ACD (up to 70% after 5 years) [53], considering that the total negativity or decline of antibodies achieved 4.5 years after the outbreak was only 50%. This finding brings to light the possibility of hypotheses such as pre-exposure (as some of the patients already had positive IgG in the first sample), or re-exposure to the pathogen. This could mean that patients already had the indeterminate chronic form of the disease, contributing to therapeutic failure. Moreover, if additional samples had been obtained after shorter time intervals, this would have enabled better analysis on the kinetics of antibodies. Nonetheless, it has previously been noted that the decline in IgG titers can take many years, depending on the form of infection [54,55].

Molecular diagnosis has restricted use and is performed only by research centers or reference laboratories, due to the lack of defined protocols and standardized operational procedures, as well as the scarcity of commercial kits for use in routine surveillance. To date, only one kit has been approved for use in Brazil, the NAT Chagas Kit, developed by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) in partnership with the Institute of Molecular Biology of Paraná (IBMP), and its use is still far from being universal [18]. Despite the diagnostic complexity of CD in all of its phases, we obtained excellent results using conventional PCR to detect and identify *T. cruzi* in the clinical samples evaluated. These specific primers were previously described in the literature by Wincker et al. (1994) [56] and have been widely used as an adjunct to serological tests in diagnosing this disease. In a recent meta-analysis, in which several molecular biology methods were compared, Pascual-Vázquez et al. (2023) [57] demonstrated that it is not yet possible to determine the most effective molecular protocol because of the heterogeneity of the studies. In the present study, positivity was found through conventional PCR in 100% of the samples tested, even in patients whose other tests were all negative. This result is in line with reports on other outbreaks [58,59,60]. There is an urgent need, for standardization of at least one molecular biology technique, so that this method can be used for routine diagnosis of ACD.

Genotyping is a powerful tool for investigating orally transmitted outbreaks of CD. *Trypanosoma cruzi* is divided into at least seven lineages, as discrete typing units (DTUs), from TcI to TcVI and Tcbat (there is no consensus regarding the definition of the latter as a distinct DTU) [61,62,63]. Velásquez-Ortiz et al. (2022) demonstrated that DTUs are widely distributed across all countries, and in Brazil most cases are associated with TcI [64]. However, it is important to highlight that other genotypes have also been reported, like TcIII and TcIV [60,65,66]. In northeastern Brazil, the most frequent forms are TcI and TcIV [67]. The present study did not have the aim of analyzing the clonal aspect of *T. cruzi* strains. However, construction of a phylogenetic tree containing 33 sequences from this outbreak together with another 77 sequences extracted from another Brazilian outbreak from Pará state showed a genetic similarity ranging from 94.8 to 100.0%, demonstrated that the evolutionary distances are low and may represent a common source. Molecular studies are needed in order to better evaluate the transmission dynamics or origin of these strains.

In the oral transmission route, the triatomine is accidentally macerated together with fruit or food is directly contaminated by its feces when left unprotected. The species most frequently involved in Colombia and Venezuela is *P. geniculatus*. In Brazil, greater variability of species has been found, but most of them have belonged to the genera *Triatoma* and *Panstrongylus* [68]. Entomological surveillance is of great importance for better understanding the life cycle and persistence of *T. cruzi* in nature. We distributed PITs throughout the community and kept them there for six months. In this study, 27 viable triatomines were found, of which more than

90% were *Rhodnius pictipes*, all in peridomestic areas. No species were found inside houses. Previously, only two outbreaks (in Brazil and Colombia) had reported this vector as probably involved in transmission [69,70], but its ability to transmit the disease was recently demonstrated in an experimental study [71]. The infection rate was 33.3%, which despite being higher than in most surveillance in Brazil, was in line with findings from studies in other states, where rates above 30% and up to 70% were found in peridomestic areas [72,73,74].

All the patients were treated with the only drug available in Brazil, benznidazole. This is a medication with a high rate of adverse reactions. Fortunately, suspension of the medication was only necessary due to adverse reactions in the cases of two patients, and both of these individuals received the treatment for 30 days, a period considered adequate. However, management of the treatment was quite arduous, given the need to use symptomatic medication in most patients. The MULTIBENZ trial [75], a randomized, double-blind, phase 2b multicentric trial, tested benznidazole treatment in three different regimens (300 mg/day for 60 days, 150 mg/day for 60 days, and 400 mg/day for 15 days) with similar results regarding parasitological responses. This suggests that reducing dosage or duration of treatment can contribute to better adherence and greater coverage. It is imperative that new initiatives, such as DNDi, are funded to develop new drugs or shorter therapeutic regimens.

The lethality of an outbreak is quite variable and can be influenced by four factors: the phenotype of the pathogen; the ingested parasite load; the individuals' susceptibility; and whether treatment was started early on. A recent meta-analysis demonstrated that the overall lethality of ACD is around 1%, but it also showed that lethality can reach up to 30% in large outbreaks (with more than 10 patients) [76]. It was not possible to analyze the first three factors mentioned above. Regarding early treatment, the mean length of time between symptom onset and treatment was 16.6 days (ranging from 6 to 54 days). This demonstrates that action was implemented quickly by the surveillance center, which may have had an impact on the absence of lethal outcomes.

Most orally transmitted ACD cases have occurred after ingestion of fresh juices, like açai (*Euterpe oleracea*) and sugar cane (*Saccharum spp.*). However, other beverages have also been cited [76,77]. In this event, the most probable source was bacaba juice. This was the first time that this fruit had been reported to be involved in an outbreak in the state of Maranhão but reports of this in Venezuela and another Brazilian state have already been published [66,78]. At first sight, it may seem that this is a problem restricted to remote and highly vulnerable locations, but a study demonstrated the presence of *T. cruzi* in açai products sold in markets in Rio de Janeiro, Brazil, which is well outside the Amazon region [79]. Furthermore, from the perspective of the "One Health approach", with intense human migration and exporting of natural products from endemic areas, CD can already be considered to be a global health problem: papers published in European and North American countries have demonstrated this concern [80]. It is also important to mention a study that demonstrated the presence of infected triatomines in a densely populated area in the northeastern region of the United States, a non-endemic area [79]. Therefore, there is an urgent need to implement safe food production programs, aligned with better diagnostic and therapeutic tools.

After this outbreak, a series of training sessions were conducted among the municipality's healthcare team and communities, with the aim of raising awareness of the importance of Chagas disease and training in safe processing, in accordance with national guides [26]. Given that the foods involved in its transmission are the only source of survival for most people in the region, stopping eating them is not an option. The population was trained to produce this food in a safer way, while maintaining the artisanal process, but this did not constitute a guidance policy extended to the entire state.

The limitations of this study are all related to the resource limitations of the municipalities and the state. It was not possible to perform an adequate cardiological assessment on all patients, restricting the clinical analysis; it was not possible to carry out other collections in a shorter period of time, making it impossible to analyze the serological kinetics; nor was it possible to collect new PCR samples.

This event demonstrates that there is still a long way to go before this disease is controlled. As mentioned previously, the status of CD as a neglected tropical disease means that controlling or eradicating it through applying public health strategies remains possible. Despite the contemporary nature of the difficulties described here, they remain very similar to those at the time of its discovery. Even after more than a century, Carlos Chagas is still right when he said:

"Will it be possible, within public hygiene, to find efficacious ways of attenuating this affliction? We believe so, if this problem—most surely a problem of the State and of humanity—becomes the concern of a scientifically well-advised statesman."

(Chagas, 1917) [81].

As globalization breaks all borders through the migration of people and the exporting of raw materials, we postulate here that we must spread Carlos Chagas' thoughts throughout the world.

5. Conclusions

Chagas disease is a classic NTD with a special characteristic: it is called "the silent disease". The ability of this disease to keep the host virtually asymptomatic for a long time allows it to thrive. In this study, we present all the barriers encountered in managing real-life situations of an acute event: the vulnerability of the population; the dependence on old diagnostic techniques, together with little interest in developing microscopy professionals; lack of standardization of molecular biology techniques; few therapeutic options, with many side effects; and the neglect of governments to perform the basic testing and adequate follow up of affected people. The latter ended up being the limiting factor of this study, as it was not possible to perform basic cardiological assessment tests in all patients, serial serologies in shorter times and other molecular biology samples. We demonstrated that rapid surveillance action with early initiation of treatment culminated in an outbreak without deaths. To improve early treatment, it is necessary to invest in better diagnostic techniques and make them widely available. We also demonstrated and propose that polymerase chain reaction should be standardized within the diagnostic routine in all cases with negative parasitology. Acute Chagas disease is a threat to public health. While advances in vector control have been achieved, the peridomestic and sylvatic cycle remains active, thus perpetuating the parasite in nature. The most vulnerable populations continue to be those in extreme poverty, without access to basic sanitation, or who live near the Amazon rainforest. However, as the beverages that are classically involved in oral transmission are increasingly exported to other regions, and with the intense human migration that has been occurring increasingly, outbreaks in non-endemic regions are an additional concern in relation to controlling CD. Until everyone looks at the problem from a "One Health" perspective, no nation is safe from Chagas disease.

Supporting information

S1 Fig. Electrophoretic profiles of PCR products of the variable region of the kDNA minicircle obtained with DNA from some clinical samples of patients with Chagas disease. (DOCX)

S2 Fig. Phylogenetic tree of the 33 samples from the outbreak along with 77 samples from another outbreak.

(DOCX)

S1 Text. Methodology of polymerase chain reaction.

(DOCX)

S2 Text. Methodology of blood smear technique.

(DOCX)

S3 Text. Methodology of safe preparation of bacaba juice.

(DOCX)

S1 Table. Demographic, clinical and laboratory characteristics of 39 cases of acute Chagas disease.

(DOCX)

Acknowledgments

The authors thank the State Health Department of Maranhão (SES/MA) and the Oswaldo Cruz Institute—Central Public Health Laboratory of Maranhão (IOC-LACEN/MA) for their logistical support and analyses on laboratory tests. The authors also thank the Foundation for Support of Scientific Research and Technological Development of Maranhão (FAPEMA) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Author Contributions

Conceptualization: Eudes Alves Simões-Neto, Jackson Maurício Lopes Costa, Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo.

Data curation: Eudes Alves Simões-Neto.

Formal analysis: Eudes Alves Simões-Neto, Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo.

Investigation: Eudes Alves Simões-Neto, Maria Rosa Quaresma Bomfim, Jackson Maurício Lopes Costa, Amanda Ferreira Simões, Domingos Carvalho Sodré, Ana Cleide Mineu Costa, Samuel Vieira Rodrigues Dumont, Bruna de Oliveira de Melo.

Methodology: Eudes Alves Simões-Neto, Daniel Wagner de Castro Lima Santos, Maria Rosa Quaresma Bomfim.

Project administration: Eudes Alves Simões-Neto, Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo.

Resources: Maria Rosa Quaresma Bomfim.

Supervision: Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo.

Validation: Daniel Wagner de Castro Lima Santos, Maria Rosa Quaresma Bomfim, Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo.

Visualization: Eudes Alves Simões-Neto, Amanda Ferreira Simões.

Writing – original draft: Eudes Alves Simões-Neto, Lucas Dias Vasconcelos.

Writing – review & editing: Eudes Alves Simões-Neto, Daniel Wagner de Castro Lima Santos, Maria Rosa Quaresma Bomfim, Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo.

References

- Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, Sandri TL. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health*. 2019 Jul 2; 7:166. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166> PMID: 31312626
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 375(9723):1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X) PMID: 20399979
- Malecela MN, Ducker C. A road map for neglected tropical diseases 2021–2030. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2021; 115(2):121–123. <https://doi.org/10.1093/trstmh/traab002> PMID: 33508095
- Chagas C 1908. *Trypanosoma minasense*: Nota preliminar. *Brasil Médico* 22: 471.
- Chagas C 1909 c. Nova espécie mórbida do homem, produzida por um *Trypanozoma* (*Trypanozoma cruzi*): Nota prévia. *Brasil Médico* 23: 161.
- Chagas C 1909 d. Nova tripanossomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1: 159–218.
- Chagas C 1910a. Aspecto clínico geral da nova entidade mórbida produzida pelo *Schizotrypanum cruzi*. Nota prévia. *Brasil Médico* 24: 263–265
- Gómez-Ochoa SA, Rojas LZ, Echeverría LE, Muka T, Franco OH. Global, Regional, and National Trends of Chagas Disease from 1990 to 2019: Comprehensive Analysis of the Global Burden of Disease Study. *Glob Heart*. 2022; 17(1):59. Published 2022 Aug 24. <https://doi.org/10.5334/gh.1150> PMID: 36051318
- Martins-Melo FR, Castro MC, Wernick GL. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000–2019. *Acta Trop*. 2021; 220:105948. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105948> PMID: 33971159
- Franco-Paredes C, Villamil-Gómez WE, Schultz J, Henao-Martínez AF, Parra-Henao G, Rassi A Jr, et al. A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America—Public health and travel medicine importance. *Travel Med Infect Dis*. 2020 Jul–Aug; 36:101565. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101565> Epub 2020 Jan 29. PMID: 32004732
- Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018; 391(10115):82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4) PMID: 28673423
- Brazil, Ministry of Health. Notifiable Diseases Information System—Sinan Net; 2024 [cited 2024 Apr 5th]. [Internet]. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/chagasbr.def>
- Pan American Health Organization. 49th Directing Council, 61th session of the regional committee of WHO for the Americas. Washington, D.C.: PAHO; 2009. [Internet]. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/20>.
- Pan American Health Organization. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. Washington, D.C.: PAHO; 2019. [Internet]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789275120439>.
- Egúez KE, Alonso-Padilla J, Terán C, Chipana Z, García W, Torrico F, et al. Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Apr 3; 11(4):e0005501. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005501> PMID: 28369081
- Rivero R, Santini MS, Lopez-Albizu C, Rodriguez M, Calbosa A, Oliveto D, et al. Comparative evaluation of four rapid diagnostic tests that detect human *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies to support diagnosis of Chagas Disease in urban population of Argentina. *PLoS Negl Trop Dis*. 2024 Mar 15; 18(3):e0011997. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011997> PMID: 38489395
- Moreira OC, Fernandes AG, Gomes NLDS, Dos Santos CM, Jacomasso T, Costa ADT, et al. Validation of the NAT Chagas IVD Kit for the Detection and Quantification of *Trypanosoma cruzi* in Blood Samples of Patients with Chagas Disease. *Life* (Basel). 2023 May 24; 13(6):1236. <https://doi.org/10.3390/ife13061236> PMID: 37374019
- Candia-Puma MA, Machaca-Luque LY, Roque-Pumahuanca BM, Galdino AS, Giunchetti RC, Coelho EAF, Chávez-Fumagalli MA. Accuracy of Diagnostic Tests for the Detection of Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics* (Basel). 2022 Nov 10; 12(11):2752. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12112752> PMID: 36359595
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Treviño B, Serre N, Sao Avilés A, Almirante B. Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Oct; 59(10):6125–31. <https://doi.org/10.1128/AAC.04660-14> Epub 2015 Jul 20. PMID: 26195525
- Lascano F, García Boumissen F, Altcheh J. Review of pharmacological options for the treatment of Chagas disease. *Br J Clin Pharmacol*. 2022; 88(2):383–402. <https://doi.org/10.1111/bcp.14700> PMID: 33314266

21. González S, Wall RJ, Thomas J, Brailard S, Brunori G, Camino Díaz I, et al. Short-course combination treatment for experimental chronic Chagas disease. *Sci Transl Med*. 2023 Dec 13; 15(726):eadg8105. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adg8105> Epub 2023 Dec 13. PMID: 38091410
22. Cafferata ML, Toscani MA, Althabe F, Belizán JM, Bergel E, Bernueta M, et al. Short-course Benznidazole treatment to reduce *Trypanosoma cruzi* parasitic load in women of reproductive age (BETTY): a non-inferiority randomized controlled trial study protocol. *Reprod Health*. 2020 Aug 24; 17(1):128. <https://doi.org/10.1186/s12978-020-00972-1> PMID: 32831069
23. Barros FB, de Aguiar Azevedo P. Common opossum (*Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758): food and medicine for people in the Amazon. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2014; 10:65. Published 2014 Sep 10. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-65> PMID: 25209094
24. FIOCRUZ. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). Rio de Janeiro, 2014. [cited 2024 Jun 26]. [Internet]. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doenca-de-chagas>
25. SEBRAE. Boas práticas para os batedores artesanais de açaí. Brasília, DF: Sebrae, 2013a. 54 p. il. PAS-Açaí. Programa Alimentos Seguros. 54 p.: il.; tab.; 29 cm (Série qualidade e segurança dos alimentos).
26. IBGE—INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Brasileiro de 2022; Rio de Janeiro: IBGE, 2022. [cited 2024 Apr 15]. [Internet]. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ma/panorama>
27. Cutrim FSRF. Estudo dos casos agudos de doença de Chagas no Maranhão, Brasil, e sua relação com a pobreza. Rio de Janeiro, 2017. PhD Thesis, Instituto Oswaldo Cruz. 2017. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/49474>
28. Silva-Dos-Santos D, Barreto-de-Albuquerque J, Guerra B, Moreira OC, Berbert LR, Ramos MT, et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Apr 5; 11(4):e0005507. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507> PMID: 28379959
29. Pinto AY, Valente SA, Valente Vda C, Ferreira Junior AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005 [Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(6):602–614. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822008000600011>
30. Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009 Apr; 15(4):653–5. <https://doi.org/10.3201/eid1504.081450> PMID: 19331764
31. Coura JR, Vñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010; 465(7301):S6–S7. <https://doi.org/10.1038/nature09221> PMID: 20571554
32. Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, Noya O. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 May; 110(3):377–86. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140285> Epub 2015 Apr 28. PMID: 25946155
33. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012; 54(6):845–852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956> PMID: 22238161
34. Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1991 Sep-Oct; 33(5):351–7. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651991000500003> PMID: 1844961
35. Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Jun 15; 4(6):e711. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000711> PMID: 20559542
36. Vargas A, Malta JMAS, Costa VMD, Claudio LDG, Alves RV, Cordeiro GS, et al. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016 [Investigation of an outbreak of acute Chagas disease outside the Amazon Region, in Rio Grande do Norte State, Brazil, 2016]. *Cad Saude Publica*. 2018; 34(1):e00006517. Published 2018 Feb 5. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00006517>
37. Brazil, Ministry of Health. Health Surveillance Guide: vol 2; 6. Ed, Brasília, Health Ministry, 2023 [Internet]. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigilancia/guia-de-vigilancia-em-saude-volume-2-6a-edicao/view>
38. Schijman AG, Alonso-Padilla J, Longhi SA, Picado A. Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic Chagas disease: from field to laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022; 117:e200444. Published 2022 May 23. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200444> PMID: 35613155

39. de Castro AM, Luqueti AO, Rassi A, Chiari E, Galvão LM. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res*. 2006; 99(4):379–383. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0172-5> PMID: 16570199
40. de Sousa AS, Vermeij D, Ramos AN Jr, Luqueti AO. Chagas disease. *Lancet*. 2024; 403(10422):203–218. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01787-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01787-7) PMID: 38071985
41. Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Zavala-Jaspe R, Abate T, Contreras R, et al. The performance of laboratory tests in the management of a large outbreak of orally transmitted Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Nov; 107(7):893–8. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000700009> PMID: 23147145
42. Pinto AYN, Farias JR, Marcal AS, Galucio AL, Costi RR, Valente VC, Valente SAS. Doença de Chagas Aguda grave autóctone na Amazônia brasileira. *Revista Paraense de Medicina* 2007; 21:7–12.
43. Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Jan; 60(1):25–32. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.016> Epub 2007 Sep 24. PMID: 17889480
44. Suárez C, Nolder D, García-Mingo A, Moore DAI, Chiodini PL. Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas. *Res Rep Trop Med*. 2022; 13:25–40. Published 2022 Jul 22. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S278135> PMID: 35912165
45. Gabaldón-Figueira JC, Skjette M, Longhi S, Escabia E, García LJ, Ros-Lucas A, et al. Practical diagnostic algorithms for Chagas disease: a focus on low resource settings. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2023 Jul-Dec; 21(12):1287–1299. <https://doi.org/10.1080/14787210.2023.2279110> Epub 2023 Nov 24. PMID: 37933443
46. Krettli AU, Brener Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J Immunol*. 1982; 128(5):2009–2012.
47. Galvão LM, Nunes RM, Cançado JR, Brener Z, Krettli AU. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993; 87(2):220–223. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90501-q](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90501-q) PMID: 8337734
48. Martins-Filho OA, Eloi-Santos SM, Teixeira Carvalho A, Oliveira RC, Rassi A, Luqueti AO, et al. Double-blind study to evaluate flow cytometry analysis of anti-live trypomastigote antibodies for monitoring treatment efficacy in cases of human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Sep; 9(5):1107–13. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.5.1107-1113.2002> PMID: 12204967
49. Wendling AP, Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Geiger SM, Teixeira-Carvalho A, Gontijo ED, et al. The use of IgG antibodies in conventional and non-conventional immunodiagnostic tests for early prognosis after treatment of Chagas disease. *J Immunol Methods*. 2011 Jul 29; 370(1–2):24–34. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.05.003> Epub 2011 May 17. PMID: 21620855
50. Fabbro D, Velazquez E, Bizai ML, Denner S, Olivera V, Arias E, et al. Evaluation of the ELISA-F29 test as an early marker of therapeutic efficacy in adults with chronic Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013; 55(3):S0036-46652013000300167. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000300005> PMID: 23740013
51. de Lana M, Martins-Filho OA. Revisiting the Posttherapeutic Cure Criterion in Chagas Disease: Time for New Methods, More Questions, Doubts, and Polemics or Time to Change Old Concepts? *Biomed Res Int*. 2015; 2015:652985. <https://doi.org/10.1155/2015/652985> PMID: 26583124
52. Moreira CHV, Bierenbach AL, Taconelli CA, de Oliveira-da Silva LC, Buss LF, Keating SM, et al. Parasitemia and antibody response to benznidazole treatment in a cohort of patients with chronic Chagas disease. *Front. Parasitol*. 2:1235925. <https://doi.org/10.3389/fpara.2023.1235925>
53. Buss LF, Campos de Oliveira-da Silva L, Moreira CHV, Manuli ER, Sales FC, Moraes I, et al. Declining antibody levels to *Trypanosoma cruzi* correlate with polymerase chain reaction positivity and electrocardiographic changes in a retrospective cohort of untreated Brazilian blood donors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Oct 27; 14(10):e0008787. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008787> PMID: 33108390
54. Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(1):3–24. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000100001> PMID: 11992141
55. Cançado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002; 44(1):29–37. PMID: 11896410
56. Wincker P, Brito C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 51(6):771–777. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.771> PMID: 7810810
57. Pascual-Vázquez G, Alonso-Sardón M, Rodríguez-Alonso B, Pardo-Lledías J, Romero Alegría A, Fernández-Soto P, et al. Molecular diagnosis of Chagas disease: a systematic review and meta-analysis.

- Infect Dis Poverty. 2023 Oct 16; 12(1):95. <https://doi.org/10.1186/s40249-023-01143-7> PMID: 37845734
58. Hernández C, Cucunubá Z, Flórez C, Olivera M, Valencia C, Zambrano P, et al. Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Sep 20; 10(9):e0004997. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004997> Erratum in: *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Oct 28; 10(10):e0005112. PMID: 27648938
 59. Souza-Lima Rde C, Barbosa Md, Coura JR, Arcanjo AR, Nascimento Ada S, Ferreira JM, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 Jul-Aug; 46(4):510–4. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-1367-2013> PMID: 23681429
 60. Santana RAG, Guerra MGVB, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz JV, Oliveira M, et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2019 Jan; 25(1):132–135. <https://doi.org/10.3201/eid2501.180646> PMID: 30561299
 61. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012 Mar; 12(2):240–53. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009> Epub 2011 Dec 27. PMID: 22226704
 62. Lima L, Espinosa-Alvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop*. 2015 Nov; 151:166–77. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015> Epub 2015 Jul 19. PMID: 26200788
 63. Zingales B, Macedo AM. Fifteen Years after the Definition of *Trypanosoma cruzi* DTUs: What Have We Learned? *Life (Basel)*. 2023; 13(12):2339. Published 2023 Dec 14. <https://doi.org/10.3390/life13122339> PMID: 38137940
 64. Velásquez-Ortiz N, Herrera G, Hernández C, Muñoz M, Ramírez JD. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*: Geographical and biological distribution in the Americas. *Sci Data*. 2022; 9(1):360. Published 2022 Jun 24. <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01452-w> PMID: 35750679
 65. Monteiro WM, Magalhães LK, Santana Filho FS, Borborema M, Silveira H, Barbosa Md. *Trypanosoma cruzi* TcIII/23 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. *Trop Med Int Health*. 2010; 15(9):1049–1051. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02577.x> PMID: 20579319
 66. Esper HR, Freitas VLT, Assy JGPL, Shimoda EY, Berreta OCP, Lopes MH, França FOS. Fatal evolution of acute Chagas disease in a child from Northern Brazil: factors that determine poor prognosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019 May 6; 61:e27. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961027> PMID: 31066753
 67. Freitas VLT, Píotto MR, Esper HR, Nakanishi EYS, Fonseca CA, Assy JGPL, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* DTUs TcI and TcIV in two outbreaks of orally-transmitted Chagas disease in the Northern region of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2023 Jan 16; 65:e7. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202365007> PMID: 36651468
 68. López-García A, Gilabert JA. Oral transmission of Chagas disease from a One Health approach: A systematic review. *Trop Med Int Health*. 2023; 28(9):689–698. <https://doi.org/10.1111/tmi.13915> PMID: 37488635
 69. Valente SA, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa César M, dos Santos MP, Miranda CO, et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009 Mar; 103(3):291–7. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.10.047> Epub 2008 Dec 31. PMID: 19118852
 70. Hernández C, Vera MJ, Cucunubá Z, Flórez C, Cantillo O, Buitrago LS, et al. High-Resolution Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* in 2 Large Outbreaks of Acute Chagas Disease in Colombia. *J Infect Dis*. 2016 Oct 15; 214(8):1252–5. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw360> Epub 2016 Aug 10. PMID: 27511897
 71. de Abreu AP, Lucas da Silva HF, Sarto MPM, Iunklaus GF, Trovo JV, de Souza Fernandes N, et al. Infection susceptibility and vector competence of *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 and *R. pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) for strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) I, II and IV. *Parasit Vectors*. 2022 Jun 30; 15(1):239. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05350-3> PMID: 35773725
 72. Barbosa-Silva AN, Câmara AC, Martins K, Nunes DF, Oliveira PI, Azevedo PR, et al. Characteristics of Triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016 Feb; 49(1):57–67. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0300-2015> PMID: 27163565
 73. Barbosa-Silva AN, Souza RCM, Diotallevi L, Aguiar LMA, Câmara ACJD, Galvão LMDC, Chiari E. Synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae): infestation, colonization, and natural infection by

- trypanosomatids in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019 Jul 18; 52: e20190061. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0061-2019> PMID: 31340365
74. Paixão DDS, Portela Madeira F, Costa de Jesus A, Paixão HCDS, Camargo JSAA, Ribeiro MAL, et al. Mapping the Silent Threat: A Comprehensive Analysis of Chagas Disease Occurrence in Riverside Communities in the Western Amazon. *Pathogens*. 2024 Feb 15; 13(2):176. <https://doi.org/10.3390/pathogens13020176> PMID: 38392913
 75. Bosch-Nicolau P, Fernández ML, Sulleiro E, Villar JC, Perez-Molina JA, Correa-Oliveira R, et al; MULTIBENZ Study Group. Efficacy of three benznidazole dosing strategies for adults living with chronic Chagas disease (MULTIBENZ): an international, randomised, double-blind, phase 2b trial. *Lancet Infect Dis*. 2024 Apr; 24(4):386–394. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00629-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00629-1) Epub 2024 Jan 11. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2024 Apr; 24(4):e221. PMID: 38218195
 76. Bruneto EG, Fernandes-Silva MM, Toledo-Cornell C, Martins S, Ferreira JMB, Corrêa VR, et al. Case-fatality From Orally-transmitted Acute Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2021 Mar 15; 72(6):1084–1092. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1148> PMID: 32772104
 77. Benítez JA, Araujo B, Contreras K, Rivas M, Ramírez P, Guerra W, et al. Urban outbreak of acute orally acquired Chagas disease in Táchira, Venezuela. *J Infect Dev Ctries*. 2013 Aug 15; 7(8):838–41. <https://doi.org/10.3855/jidc.3620> PMID: 23949301
 78. Ferreira RTB, Cabral ML, Martins RS, Araujo PF, da Silva SA, Brito C, et al. Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from açai products commercialized in Rio de Janeiro and Pará, Brazil. *Parasit Vectors*. 2018 Apr 10; 11(1):233. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2699-6> PMID: 29636097
 79. Peterson JK, Hoyos J, Bartlett CR, Gottdenker NL, Kunkel B, Murphy C, Alvarado A. First Report of Chagas Disease Vector Species *Triatoma sanguisuga* (Hemiptera: Reduviidae) Infected with *Trypanosoma cruzi* in Delaware. *Am J Trop Med Hyg*. 2024 Mar 26; 110(5):925–929. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.23-0915> PMID: 38531096
 80. Gonzalez-Sanz M, Crespillo-Andújar C, Chamorro-Tojeiro S, Monge-Maillo B, Perez-Molina JA, Norman FF. Chagas Disease in Europe. *Trop Med Infect Dis*. 2023; 8(12):513. Published 2023 Dec 1. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8120513> PMID: 38133445
 81. Kropf SP, Lacerda, AL. Carlos Chagas, um cientista do Brasil = Carlos Chagas, scientist of Brazil [online]. Translated by Diane Groszklaus Whitty. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2009, 306 p. ISBN: 978-65-5708-000-9.

APÊNDICE B – Demais publicações no curso do doutorado

Periódico BMC Infectious Diseases,

Qualis A3, Fator de impacto 3.4

<https://doi.org/10.1186/s12879-020-05622-2>

Cunha et al. *BMC Infectious Diseases* (2020) 20:885
<https://doi.org/10.1186/s12879-020-05622-2>

BMC Infectious Diseases

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Frequency of *Leishmania* spp. infection among HIV-infected patients living in an urban area in Brazil: a cross-sectional study



M. A. Cunha^{1,2*}, B. J. Celeste³, N. Kesper⁴, M. Fugimori³, M. M. Lago⁵, A. S. Ibanes⁵, L. M. Ouki⁵, E. A. Simões Neto⁶, F. F. Fonseca⁷, M. A. L. Silva⁸, W. L. Barbosa Júnior⁸ and J. A. L. Lindoso^{2,4,5}

Abstract

Background: There is little information about the frequency of *Leishmania* infection in asymptomatic people living with HIV (PLWH) and about the performance of laboratory diagnostic methods in coinfecting patients in Latin America. The main objective of this study is to evaluate the frequency of *Leishmania* spp. infection in HIV-infected patients living in an urban area in Brazil.

Methods: To detect *Leishmania* infection, diagnostic tests were performed to detect anti-*Leishmania* antibodies (ELISA using *Leptomonas seymouri* antigens; ELISA using rK39 antigens; ELISA using rK28 antigens; indirect fluorescent-antibody test (IFAT); direct agglutination test (DAT)) and *Leishmania* DNA (polymerase chain reaction (PCR) with the target genes kDNA and ITS-1).

Results: The frequency of at least one positive test was 15%. For ELISA using *Leptomonas* antigens and IFAT, there was an association between CD4+ T lymphocyte counts and test positivity, with a higher positivity of these tests in more immunosuppressed patients (CD4+ T cell count < 200/mm³).

Conclusions: According to our data, there was a high prevalence of *Leishmania* spp. infections in this population living with HIV. Although there is the possibility of cross-reaction, some tests that are considered highly specific for the diagnosis of *Leishmania* infection were positive. There was also an association between the positivity of some tests studied and lower values of CD4+ T lymphocytes.

Keywords: Leishmaniasis, Acquired immunodeficiency syndrome, Diagnosis, Prevalence

Background

Leishmaniasis is one of the most common neglected tropical diseases, and approximately 350 million people live in areas where there is a risk of infection [1]. In the Americas, 96% of visceral leishmaniasis (VL) cases occur in Brazil [2]. Considered a rural disease until 1980, VL

has spread in recent decades to large cities across the country. There was a decrease in the proportion of cases reported by the northeastern states and an increase in autochthonous transmission in larger cities (populations of > 100,000), including some cities in the state of São Paulo, [3] where this study is conducted.

In PLWH, leishmaniasis may be an opportunistic infection, and coinfection has become a problem in several parts of the world, especially in East Africa, Brazil and India. Although atypical cases and more severe cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis have been reported in PLWH, visceral leishmaniasis is responsible

* Correspondence: mirellaac@gmail.com

¹Department of Infectious Diseases, Federal University of Rio Grande do Norte, Rua Cônego Monte, 110, Quintas, Natal/RN, Rio Grande do Norte 59037-170, Brazil

²Department of Infectious and Parasitic Diseases, University of São Paulo Medical School, São Paulo, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

APÊNDICE B – Demais publicações no curso do doutorado (continuação)

Periódico Revista de Saúde Pública

Qualis A3, Fator de impacto 2.1

<https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2020054003278>

Rev Saude Publica. 2020;54:131

Original Article

RSP

Revista de
Saúde Pública

<http://www.rsp.fsp.usp.br/>

Population-based seroprevalence of SARS-CoV-2 and the herd immunity threshold in Maranhão

Antônio Augusto Moura da Silva^I , Lídio Gonçalves Lima-Neto^{II,III} , Conceição de Marla Pedrozo e Silva de Azevedo^{IV} , Léa Márcia Melo da Costa^{VI} , Maylla Luanna Barbosa Martins Bragança^{VII} , Allan Kardec Duallibe Barros Filho^{VIII} , Bernardo Bastos Wittlin^{IX} , Bruno Feres de Souza^X , Bruno Luciano Carneiro Alves de Oliveira^{XI} , Carolina Abreu de Carvalho^{XII} , Erika Barbara Abreu Fonseca Thomaz^I , Eudes Alves Simões-Neto^{XXII} , Jamesson Ferreira Leite Júnior^{XIII} , Lécia Marla Sousa Santos Cosme^{IV} , Marcos Adriano Garcia Campos^{XIV} , Rejane Christine de Sousa Quelroz^I , Sérgio Souza Costa^X , Vitória Abreu de Carvalho^{XV} , Vanda Marla Ferreira Simões^I , Marla Teresa Seabra Soares de Brito e Alves^I , Alcione Miranda dos Santos^I 

^I Universidade Federal do Maranhão. Departamento de Saúde Pública. São Luís, MA, Brasil

^{II} Secretaria de Saúde do Estado do Maranhão. Laboratório Central do Maranhão. São Luís, MA, Brasil

^{III} Universidade CEUMA. São Luís, MA, Brasil

^{IV} Universidade Federal do Maranhão. Departamento de Medicina I. São Luís, MA, Brasil

^V Secretaria de Saúde do Estado do Maranhão. Hospital Presidente Vargas. São Luís, MA, Brasil

^{VI} Secretaria de Saúde do Estado do Maranhão. Assessoria. São Luís, MA, Brasil

^{VII} Universidade Federal do Maranhão. Departamento de Ciências Fisiológicas. São Luís, MA, Brasil

^{VIII} Universidade Federal do Maranhão. Departamento de Engenharia Elétrica. São Luís, MA, Brasil

^{IX} Universidade Federal do Maranhão. Hospital Universitário. São Luís, MA, Brasil

^X Universidade Federal do Maranhão. Departamento de Engenharia da Computação. São Luís, MA, Brasil

^{XI} Universidade Federal do Maranhão. Curso de Medicina. Pinheiro, MA, Brasil

^{XII} Secretaria Municipal de Saúde. São Luís, MA, Brasil

^{XIII} Secretaria de Saúde do Estado do Maranhão. Centro de Informações Estratégicas de Vigilância em Saúde. São Luís, MA, Brasil

^{XIV} Universidade Federal do Maranhão. Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva. São Luís, MA, Brasil

ABSTRACT

OBJECTIVE: To estimate the seroprevalence of SARS-CoV-2 in the state of Maranhão, Brazil.

METHODS: A population-based household survey was performed, from July 27, 2020 to August 8, 2020. The estimates considered clustering, stratification and non-response. Qualitative detection of IgM and IgG antibodies was performed in a fully-automated Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 electrochemiluminescence immunoassay on the Cobas® e601 analyzer (Roche Diagnostics).

RESULTS: In total, 3,156 individuals were interviewed. Seroprevalence of total antibodies against SARS-CoV-2 was 40.4% (95%CI 35.6-45.3). Population adherence to non-pharmaceutical interventions was higher at the beginning of the pandemic than in the last month. SARS-CoV-2 infection rates were significantly lower among mask wearers and among those who maintained social and physical distancing in the last month compared to their counterparts. Among the infected, 26.0% were asymptomatic. The infection fatality rate (IFR) was 0.14%, higher for men and older adults. The IFR based on excess deaths was 0.28%. The ratio of estimated infections to reported cases was 22.2.

CONCLUSIONS: To the best of our knowledge, the seroprevalence of SARS-CoV-2 estimated in this population-based survey is one of the highest reported. The local herd immunity threshold may have been reached or might be reached soon.

DESCRIPTORS: Seroepidemiologic Studies. Coronavirus Infections. Immunity. Herd. Mortality.

Correspondence:

Antônio Augusto Moura da Silva
Universidade Federal do Maranhão
Departamento de Saúde Pública
Rua Barão de Itapary, 155
65020-070 São Luís, MA, Brasil
E-mail: aamourdasilva@gmail.com

Received: Oct 23, 2020

Approved: Oct 27, 2020

How to cite: Silva AAM, Lima-Neto LG, Azevedo CMPS, Costa LMM, Bragança LMBM, Barros-Filho AKD, et al. Population-based seroprevalence of SARS-CoV-2 and the herd immunity threshold in Maranhão. Rev Saude Publica. 2020;54:131.

Copyright: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original author and source are credited.



<https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2020054003278>

1

APÊNDICE B – Demais publicações no curso do doutorado (continuação)

Periódico Infection Control & Hospital Epidemiology

Qualis A2, Fator de impacto 3.1

<https://doi.org/10.1017/ice.2022.65>

Infection Control & Hospital Epidemiology (2022), 1–7
doi:10.1017/ice.2022.65



Original Article

Healthcare-associated infections on the intensive care unit in 21 Brazilian hospitals during the early months of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: An ecological study

Ana Paula M. Porto MD¹, Igor C. Borges PhD² , Lewis Buss MD² , Anna Machado MD³, Bil R. Bassetti MD⁴ , Brunno Cocentino MD⁵, Camila S. Bicalho PhD⁶, Claudia M.D.M. Carrilho PhD⁷, Cristhieni Rodrigues PhD⁸, Eudes A.S. Neto MD⁹ , Evelyne S. Girão MD^{10,11,12}, Filipe Piastrelli MD¹³, Giovanna Sapienza MD¹⁴, Glaucia Varkulja MD¹⁵, Karin Kolbe MD¹⁶ , Luciana Passos MD¹⁷, Patricia Esteves MD¹⁸ , Pollyana Gitirana MD¹⁹, Regia D.F. Feijó MD²⁰ , Rosane L. Coutinho MD²¹ , Thais Guimarães PhD²² , Tiago L.L. Ferraz MD²³, Anna S. Levin PhD¹ , and Sílvia F. Costa PhD^{1,2} on behalf of the HAI/COVID-19 Brazilian Task Force

¹Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Hospital Maternidade de Campinas, Campinas, Brazil, ⁴Hospital Estadual Central, Vitória, Espírito Santo, Brazil, ⁵Hospital Paulistano, São Paulo, Brazil, ⁶Hospital Regional de Sorocaba Dr Adib Jatene, Sorocaba, Brazil, ⁷Hospital Universitário de Londrina, Londrina, Brazil, ⁸Hospital Santa Paula, São Paulo, Brazil, ⁹Hospital São Domingos, São Luís, Brazil, ¹⁰Hospital Regional da Unimed, Fortaleza, Brazil, ¹¹Hospital São José, Fortaleza, Brazil, ¹²Hospital Universitário Walter Cantídio, Fortaleza, Brazil, ¹³Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo, Brazil, ¹⁴Hospital Estadual de Sapopemba, São Paulo, Brazil, ¹⁵Hospital Santa Catarina, São Paulo, Brazil, ¹⁶Hospital São Luiz Unidade São Caetano, São Caetano do Sul, Brazil, ¹⁷Hospital Unimed Vitória, Vitória, Brazil, ¹⁸Hospital Estadual de Diadema Governador Orestes Quércia, Diadema, Brazil, ¹⁹Vitória Apart Hospital, Serra, Brazil, ²⁰Hospital Estadual de Vila Alpina, São Paulo, Brazil, ²¹Hospital Alvorada, São Paulo, Brazil, ²²Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, São Paulo, Brazil and ²³Real Hospital Português de Beneficência, Recife, Brazil

Abstract

Objective: The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic has caused a global health crisis and may have affected healthcare-associated infection (HAI) prevention strategies. We evaluated the impact of the COVID-19 pandemic on HAI incidence in Brazilian intensive care units (ICUs).

Methods: In this ecological study, we compared adult patients admitted to the ICU from April through June 2020 (pandemic period) with the same period in 2019 (prepandemic period) in 21 Brazilian hospitals. We used the Wilcoxon signed rank-sum test in a pairwise analysis to compare the following differences between the pandemic and the prepandemic periods: microbiologically confirmed central-line-associated bloodstream infection (CLABSI) and ventilator-associated pneumonia (VAP) incidence density (cases per 1,000 central line and ventilator days, respectively), the proportion of organisms that caused HAI, and antibiotic consumption (DDD).

Results: We detected a significant increase in median CLABSI incidence during the pandemic: 1.60 (IQR, 0.44–4.20) vs 2.81 (IQR, 1.35–6.89) ($P = .002$). We did not detect a significant difference in VAP incidence between the 2 periods. In addition, we detected a significant increase in the proportion of CLABSI caused by *Enterococcus faecalis* and *Candida* spp during the pandemic, although only the latter retained statistical significance after correction for multiple comparisons. We did not detect a significant change in ceftriaxone, piperacillin–tazobactam, meropenem, or vancomycin consumption between the studied periods.

Conclusions: There was an increase in CLABSI incidence in Brazilian ICUs during the first months of COVID-19 pandemic. Additionally, we detected an increase in the proportion of CLABSI caused by *E. faecalis* and *Candida* spp during this period. CLABSI prevention strategies must be reinforced in ICUs during the COVID-19 pandemic.

(Received 26 August 2021; accepted 2 March 2022)

Author for correspondence: Sílvia Figueiredo Costa, E-mail: silviacosta@usp.br

Cite this article: Porto APM, et al. (2022). Healthcare-associated infections on the intensive care unit in 21 Brazilian hospitals during the early months of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: An ecological study. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, <https://doi.org/10.1017/ice.2022.65>

© The Author(s), 2022. Published by Cambridge University Press on behalf of The Society for Healthcare Epidemiology of America

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic has caused a health crisis around the globe. Resources routinely used to prevent healthcare-associated infection (HAI) have been redirected toward the management of the pandemic. An informal query conducted in April 2020 found that infection prevention and control (IPC)

APÊNDICE C – Metodologias dos testes diagnósticos e do preparo seguro de suco de bacaba

1) Metodologia do parasitológico em gota espessa

- a) Adicionar uma (01) gota de solução alcoólica de Giemsa para cada mililitro de água tamponada e deixar corar por dez (10) minutos.
- b) Preparação da solução aquosa tamponada: dissolver um (01) grama de sais de fosfato em 1000 ml de água destilada.
- c) Preparação da solução aquosa de azul de metileno fosfatado: dissolver dois (02) gramas de azul de metileno fosfatado em 500 ml de água destilada.
- d) Procedimentos e técnicas para pré-coloração e coloração de amostras de sangue (lâmina de gota espessa e esfregaço) usando os métodos de Walker e Giemsa:
- e) Gota espessa, procedimentos de pré-coloração: enxaguar com a solução aquosa de azul de metileno fosfatado sobre as gotas espessas cobrindo todo o sangue na lâmina; em seguida, enxaguar com a solução aquosa tamponada sobre a lâmina e deixar correr suavemente sobre as gotas espessas, removendo o excesso da solução aquosa de azul de metileno fosfatado;
- f) Gota espessa, procedimentos de coloração: coloque a lâmina de boro na placa de coloração curva; despeje suavemente a solução aquosa de Giemsa na proporção de uma (01) gota de solução alcoólica de Giemsa para cada (01) ml de solução aquosa tamponada; deixe corar por dez (10) minutos, ajuste-o estritamente em um despertador; em seguida, enxágue suavemente com a solução aquosa tamponada sobre a lâmina e deixe escorrer suavemente sobre as gotas espessas, removendo todo o excesso de solução aquosa de Giemsa; coloque as lâminas na placa de madeira e deixe-as secar em temperatura ambiente; em seguida, leve-as ao microscópio para ler o diagnóstico;

2) Metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR)

- a) Armazenamento: amostras de soro dos pacientes foram armazenadas em freezer especial, mantendo temperatura a -80°C, no Laboratório Central do Maranhão (LACEN/MA) durante 02 anos;

- b)** Extração do material genético do parasita de amostras de sangue e amplificação por PCR: para o processo de extração de DNA de amostras de sangue foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA Blood (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado em Nanodrop (ND1000 - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e armazenado a -20°C até o uso. Para cada reação de PCR, 25 µl da mistura do kit de reação contendo 0,2 mM de cada um dos dNTPs, 2 mM de MgSO₄, 1 × tampão Taq de alta fidelidade 10X PCR Gold Buffer, 1 U foram adicionados a um tubo de PCR de Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Carlsbad CA) e 0,6 µM de cada primer específico para a região do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) de *T. cruzi*, com o primer Forward Tc121 5'AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3' e Reverse Tc122 5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3', e 1 µL de DNA molde, COMO descrito em técnica já validada previamente (WINCKER ET AL, 1994). Este par de primers amplifica um fragmento de 330 pares de bases (pb), que corresponde à região variável do minicírculo do kDNA de *T. cruzi*. O volume final foi completado para 50 µL com água livre de RNase e DNase. O ciclo de amplificação térmica começou com 2 min de ativação a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 40s, 63,5 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 min e um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 min.
- c)** Análise dos produtos amplificados por PCR: para verificar a eficiência dos ensaios de PCR e determinar o tamanho do fragmento de DNA amplificado, 8 µL do produto de PCR mais 2 µL de solução tampão (Blue/Orange 6X Loading Dye) foram aplicados a um gel de agarose a 2% (Promega, EUA) de ácido bórico a 100 V por 1 hora. Após a eletroforese, os géis foram corados com Gel Red da Biotium (1:1000) por 20 minutos e observados em um transiluminador ultravioleta. A eletroforese foi realizada por 1h a 100 Volts em tampão preparado com Tris-Borato (45mM) e 1 mM EDTA (pH 8,0) a uma concentração de 0,5X. Para determinar o tamanho dos produtos de PCR, um marcador de tamanho molecular de escada de DNA de 100pb (INVITROGEN, Life Technologies, EUA) foi incluído em cada corrida.

- d)** Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento: a purificação do produto de PCR do fragmento específico de 330pb foi feita usando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA) de acordo com as instruções do fabricante. Para verificar a pureza, a integridade e a concentração do produto purificado foram verificadas em nanodrop. O sequenciamento do produto de PCR purificado foi realizado usando o método de terminação de cadeia didesoxinucleotídica de Sanger et al. Cada fita de DNA será sequenciada em ambas as direções da fita dupla (sentido positivo e sentido negativo) com o “ABI Prism BigDye Kit” no sequenciador automático ABI 3130 Genétic Analyzer (Applied Biosystems). As amostras foram sequenciadas pelo menos duas vezes em cada direção da fita, totalizando quatro sequências da mesma amostra. Todos os sequenciamentos foram realizados pela empresa Myleus Biotecnologia Ltda, sediada em Belo Horizonte-MG.
- e)** Análise computacional das sequências: para verificar a qualidade das sequências, os eletroferogramas obtidos durante o processo de sequenciamento foram analisados usando o programa de dados ChromasPro (Technelysium Pty Ltd). A similaridade entre as sequências de nucleotídeos obtidas foi verificada pelo programa BLASTn do pacote BLAST 2.0 (Basic Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al, 1997), de onde também foram selecionadas as sequências de referência de *T. cruzi* do Genbank para análises comparativas por meio de alinhamento usando o programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al, 2007) e construção de uma árvore filogenética.
- f)** Eletroforese: foi realizada por 1 h a 100 Volts em tampão preparado com Tris-Borato (45 mM) e 1 mM EDTA (pH 8,0) na concentração de 0,5X.

3) Metodologia dos exames sorológicos

- a)** Técnica de imunoensaio enzimático (ELISA) da Bioclin:
- i)** Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30°C) por no mínimo 40 minutos.

- ii)** Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controles e Amostras (podendo ser testados em duplicata). Retornar as tiras da microplaca que não serão utilizadas para a embalagem original selada.
- iii)** Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL). 3- Pipetar 200 µL de Diluente de Amostra em todas as cavidades.
- iv)** Pipetar 10 µL de Controle Negativo, Controle Positivo e Amostra nas cavidades previamente determinadas.
- v)** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
- vi)** Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- vii)** Retirar o selador de placa das cavidades.
- viii)** Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora) ou por decantação (manual). Usar 300 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, previamente diluída* para efetuar um total de cinco (5) ciclos de lavagem. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente. Nota: Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.
- ix)** Pipetar 100 µL de Conjugado em cada cavidade. Inclusive na cavidade do Branco (caso tenha feito a opção).
- x)** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
- xi)** Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- xii)** Retirar o selador de placa das cavidades.
- xiii)** Repetir o item 8.
- xiv)** Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades.
- xv)** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placas.
- xvi)** Incubar por exatamente 30 minutos a temperatura ambiente.
- xvii)** Retirar o selador de placa das cavidades.
- xviii)** Pipetar 50 µL de Solução de Parada em todas as cavidades.
- xix)** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. 20- Ler: 450 nm (filtro primário) / 630 nm (filtro secundário) em até 30 minutos no máximo. Nota:

A reação muda de cor a cada etapa do procedimento em todas as fases.
Os reagentes são prontos para uso, exceto a Solução de Lavagem.

b) Técnica de hemaglutinação indireta (HAI) qualitativo da Wama Diagnóstica:

- i) Colocar a placa sobre um pano úmido para neutralizar as forças eletrostáticas;
- ii) Usar 1 cavidade de placa por amostra, incluindo sempre os controles positivo e negativo;
- iii) Utilizar diluição 1/32 da amostra com a solução diluente (2) com 2-mercaptoetanol (3). Recomenda-se diluir em um tubo de ensaio 10 µl da amostra + 0,31 ml da solução diluente com 2-mercaptoetanol. OBS: Não diluir soros controles positivo e negativo, pronto para uso, já diluído 1/32;
- iv) Pipetar 50 µl do soro controle positivo, negativo e da diluição 1/32 de cada amostra nas respectivas cavidades da placa. Sugere-se: A1 controle positivo, A2 controle negativo e A3, A4, A5... soros a serem testados;
- v) Adicionar 25 µl da suspensão homogênea de hemácias (1) em cada cavidade;
- vi) Agitar a placa por vibração mecânica (agitador de placas) ou batendo, com os dedos, nas bordas da placa por 3 a 4 minutos;
- vii) Deixar em repouso por 1 a 2 horas em temperatura ambiente, em local livre de vibrações (IMPORTANTE);

c) Técnica de imunofluorescência indireta (IFI) da Biomanguinhos:

- i) Limpar as lâminas e lamínulas previamente; Obs. 1: as amostras teste devem ser submetidas ao ensaio de imunofluorescência pelo menos nas diluições 1:40 e 1:80. Obs. 2: os soros controles positivo e negativo, diluídos 1:40, devem estar presentes em todas as lâminas para comparações no momento da leitura;
- ii) Fazer o protocolo de trabalho para determinar o número de lâminas a serem preparadas, considerando o número de amostras e suas diluições (1:40 e 1:80);
- iii) Adicionar 10 µL do antígeno em cada orifício da lâmina, tendo o cuidado de mantê-lo homogêneo durante o preparo. Deixar secar por 60 minutos à 37 ± 1 °C, em estufa ou “overnight” à temperatura de 15 à 30 °C; Observar

se houve uma boa fixação dos parasitas. ATENÇÃO: evitar atrito com a parte superior da lâmina onde encontram-se os parasitas fixados;

- iv)** Diluir os soros controles positivo e negativo 1:40 em PBS. Para realizar esta diluição utilizar 5 mL dos controles e adicionar 195mL de PBS. OBS: Os soros controles só devem ser manipulados no momento de sua utilização e em seguida retornar à sua temperatura de conservação (2 a 8 °C);
- v)** Diluir as amostras (1:40 e 1:80) conforme o esquema abaixo;
- vi)** Adicionar 10 µL das diluições de soro por orifício, conforme o protocolo previamente elaborado. Deve-se tomar cuidado para que as amostras não se misturem durante a incubação;
- vii)** Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos à 37 °C ± 1 °C;
- viii)** Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, em cubas de lavagem apropriadas por 5 minutos cada lavagem;
- ix)** Lavar rapidamente as lâminas, uma vez , em água destilada ou de qualidade superior;
- x)** Colocar as lâminas por 10 minutos a 37 °C ± 1 °C para secar. ATENÇÃO: Não exceder esse tempo;
- xi)** Preparar, momentos antes do uso, uma solução PBS-AE;
- xii)** Diluir o conjugado na proporção adequada, conforme titulação prévia. Adicionar 15 µL da diluição do conjugado em cada orifício das lâminas. OBS: O conjugado só deve ser manipulado no momento de sua utilização e em seguida retornar à sua temperatura de conservação (2 a 8 °C). Obs. 1: diluir somente a quantidade de conjugado necessária para utilização no mesmo dia. Obs. 2: evitar pipetar menos de 5 µL de conjugado para minimizar a possibilidade de erros na diluição;
- xiii)** Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C ± 1 °C;
- xiv)** Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, em cubas de lavagem apropriadas, por 5 minutos cada lavagem;
- xv)** Lavar rapidamente as lâminas, uma vez, em água destilada ou de qualidade superior;
- xvi)** Colocar as lâminas por 10 minutos 37 °C ± 1 °C, em estufa, para secar. OBS: Observar se as lâminas estão totalmente secas. Caso necessário

deixá-las na estufa até que estejam totalmente secas. Tomar o cuidado para não exceder muito o tempo;

- xvii)** Adicionar 1 gota de glicerina tamponada sobre cada orifício da lâmina, cobrindo-a com a lamínula. Manter as lâminas ao abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.

4) Metodologia do exame parasitológico realizado nos triatomíneos

- a)** Acondicionamento dos triatomíneos do campo para o laboratório:
- i)** Os triatomíneos capturados deverão ser colocados em recipientes próprios ou tipo coletor universal, com um papel comum em forma sanfonada e forro na base dele. Essa ação tem por finalidade aumentar a sobrevivência do (s) inseto (s) para garantir a qualidade do exame parasitológico.
- b)** Coleta da amostra e preparação das lâminas:
- i)** Com o auxílio de duas pinças, coletar as fezes por meio de uma delicada compressão no abdome do inseto, sem o sacrifício do mesmo;
 - ii)** Misturar as fezes obtidas com uma gota de soro fisiológico;
 - iii)** Cobrir com lamínula 20 x 20mm ou 22 x 22mm;
 - iv)** Ler em microscópio óptico a um aumento de 400 x;
 - v)** “Correr” a lâmina em no mínimo 100 campos, iniciando do canto esquerdo superior em direção à direita, seguindo até o canto direito inferior

5) Metodologia de preparo seguro do suco de bacaba e açaí

- a)** Higienização das frutas: colheita/peneiração: fazer uma seleção das frutas. Utilize mesa coletora ou peneira para retirar resíduos (fragmentos vegetais e pedras) e possíveis insetos que possam acompanhar a fruta;
- b)** Primeira lavagem: os frutos devem ser lavados em água potável corrente para retirar sujeiras, insetos e outros resíduos aderidos à superfície dos frutos. Recomenda-se lavar as frutas em tanque e retirar a sujeira com peneira, sacudindo bem as frutas para melhor lavagem;
- c)** Segunda lavagem (desinfecção): nesta etapa os frutos são imersos em solução clorada, com concentração de 150 ppm de cloro ativo, por 15 minutos. O sanitizante deve ser registrado no Ministério da Saúde e aprovado para uso em

contato com alimentos. Não devem ser usados alvejantes ou produtos perfumados. A solução clorada só pode ser usada uma vez;

- d) Terceira lavagem (enxágue): deve ser feita em água potável corrente. Esta etapa permite a remoção de resíduos de cloro, que conferem ao produto um sabor desagradável e podem prejudicar a saúde do consumidor. Após a limpeza, as frutas devem ser armazenadas somente em recipientes higienizados e cobertos com plástico transparente, para evitar recontaminação por poeira, respingos, insetos, etc. Devem ser manuseados com as mãos e utensílios e/ou equipamentos higienizados;
- e) Branqueamento: o clareamento é um processo térmico que promove redução da carga microbiana, principalmente da contaminação relacionada ao *Trypanosoma*. Deve-se utilizar banho com água à temperatura de 80°C por 10 segundos;
- f) Resfriamento/amolecimento: nesta etapa, as frutas devidamente higienizadas devem ser mantidas em água potável, que pode ou não ser aquecida, para resfriar e amolecer a polpa, se necessário;
- g) Despolpamento: é necessário realizar a higiene pessoal do manipulador e dos utensílios; da batedeira sempre antes de iniciar o uso e ao final das atividades;
- h) Embalagem: deve ser realizada em embalagens limpas e intactas e estas não podem ser reutilizadas;
- i) Armazenamento: devem ser acondicionados em sacos plásticos e mantidos em freezer em temperatura entre 0 e 4°C por até 24 horas. O armazenamento de diferentes tipos de alimentos no mesmo freezer pode ser feito desde que separados, embalados e identificados. O freezer deve ser mantido em boas condições de funcionamento, limpo e bem conservado. ALERTA: O *Trypanosoma* não é destruído pelo congelamento.

REFERÊNCIAS

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST e PSI-BLAST: uma nova geração de programas de busca em banco de dados de proteínas. *Nucleic Acids Res.* 1997 Set 1;25(17):3389-402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. Sequenciamento de DNA com inibidores de terminação de cadeia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dez;74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Software de Análise Genética Evolutiva Molecular (MEGA) versão 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007 agosto;24(8):1596-9. doi: 10.1093/molbev/msm092. Epub 2007 7 de maio.

Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Uso de um procedimento simplificado de reação em cadeia da polimerase para detectar *Trypanosoma cruzi* em amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos em uma área rural endêmica. *Am J Trop Med Hyg*. 1994 Dez;51(6):771-7. doi: 10.4269/ajtmh.1994.51.771.

APÊNDICE D – Características demográficas, clínicas e laboratoriais do surto de 39 casos de doença de Chagas aguda por transmissão oral, Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil, 2018 a 2022.

Tabela 4 – Características demográficas, clínicas e laboratoriais do surto de 39 casos de doença de Chagas aguda por transmissão oral, Pedro do Rosário, Maranhão, Brasil, 2018 a 2022.

ID	Gênero	Idade (anos)	Sintomas	Incubação (dias)	Dias entre sintomas e gota espessa	Gota espessa	Primeira amostra			Segunda amostra		Terceita amostra (4.5 anos após)	
							PCR	IgG ELISA	IgG IFI	IgG ELISA	IgG HAI	IgG ELISA	IgG IIF
Pacientes diagnosticados por critérios laboratoriais: parasitológico positivo OU soroconversão de IgG OU aumento de 2x nos títulos de IgG IFI													
19	M	14	Febre, linfadenopatia, astenia, dispneia, dor torácica, edema facial	10	16	POS	POS	NEG	INDET 1/40	POS	INCONC	POS	POS 1/160
24	F	68	Febre vespertina, linfadenopatia, astenia, tosse, dispneia, edema facial, diarreia	15	11	POS	POS	INDET	INDET 1/40	POS	POS	-	-
39	F	69	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrio, mialgia, astenia, dor abdominal	14	11	POS	-	NEG	POS 1/160	POS	POS	POS	INDET 1/40

1	F	10	Febre vespertina, linfadenopatia, cefaleia, astenia, edema facial	17	15	POS	-	POS	POS 1/80	POS	POS	POS	POS 1/80
2	F	40	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrios, dispneia, edema facial, dor abdominal	14	11	POS	POS	POS	POS 1/160	POS	POS	POS	INDET 1/40
3	M	58	Febre vespertina, linfadenopatia, astenia, tosse, dispneia, diarreia	4	19	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
8	M	34	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrios, mialgia, astenia	5	27	POS	POS	POS	POS 1/160	POS	POS	-	-
10	F	39	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrios, tosse, dispnéia, dor torácica, edema de membros inferiores, chagoma de inoculação??	14	17	POS	POS	POS	POS 1/80	POS	NEG	-	-
11	F	15	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrio, cefaleia, astenia	19	13	POS	POS	POS	POS 1/80	INCONC	INCONC	-	-

12	F	40	Cefaleia, astenia, tosse, dispneia, edema facial	19	13	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS 1/80
13	M	55	Febre, linfadenopatia, calafrio, cefaleia, mialgia, dispneia, dor abdominal	2	30	POS	POS	POS	POS 1/80	POS	POS	-	-
15	M	29	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrios, mialgia, astenia	11	20	POS	POS	POS	POS 1/80	-	-	-	-
16	F	52	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrios, tosse, dispneia, edema dos membros inferiores	12	20	POS	-	INDET	INDET 1/40	IND.	NEG	POS	POS 1/80
17	M	29	Febre, linfadenopatia, calafrio, astenia	18	13	POS	POS	NEG	INDET 1/40	-	-	-	-
18	F	12	Febre vespertina, linfadenopatia, cefaleia, astenia, edema facial	7	19	POS	POS	INDET	POS 1/80	-	-	-	-
20	M	24	Febre, linfadenopatia, calafrio, cefaleia, astenia, dor abdominal	15	11	POS	POS	POS	POS 1/80	POS	POS	-	-

21	M	56	Febre vespertina, linfadenopatia, tosse, dispneia, dor abdominal	10	16	POS	POS	POS	POS 1/160	POS	POS (IIF)	IND	NEG
22	F	30	Febre, linfadenopatia, calafrio, cefaleia, mialgia, tosse, dispneia, dor abdominal	13	18	POS	POS	POS	POS 1/80	POS	POS	POS	POS 1/80
23	M	12	Febre vespertina, linfadenopatia, cefaleia, mialgia, tosse, edema facial	7	19	POS	POS	POS	INDET 1/40	POS	POS	POS	POS 1/160
25	F	19	Febre, linfadenopatia, mialgia, tosse	15	11	POS	POS	POS	POS 1/80	POS	POS	NEG	NEG
26	F	13	Febre vespertina, linfadenopatia, cefaleia, mialgia, edema facial, dor abdominal	10	16	POS	POS	NEG	NEG	INCONC	INCONC	POS	POS 1/80
27	F	32	Cefaleia, tosse, dispneia, edema facial, dor abdominal	17	15	POS	POS	POS	POS 1/80	POS	POS	POS	POS 1/80
32	F	1	Febre, linfadenopatia, edema facial, dor abdominal, diarreia	15	23	POS	POS	NEG	INDET 1/40	NEG	NEG	POS	POS 1/160

5	M	33	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrios, mialgia, astenia	16	-	-	POS	POS	INDET 1/40	POS	POS IIF 1/160	POS	POS 1/160
33	M	14	Febre, linfadenopatia	28	-	-	POS	NEG	POS 1/80	POS	POS	-	-
37	F	68	Calafrio vespertino, astenia, dispneia, edema de membros inferiores, edema facial	12	-	-	-	INDET	INDET 1/40	POS	POS	POS	POS 1/160

Pacientes diagnosticados por critérios epidemiológicos: achados clínicos E vínculo epidemiológico E pelo menos um IgG reagente

4	M	28	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrio, mialgia	5	26	NEG	-	POS	POS 1/80	POS	POS	NEG	NEG
6	M	37	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrios, mialgia, astenia	24	8	NEG	-	POS	POS 1/80	POS	POS	POS	POS 1/80
7	M	50	Febre, linfadenopatia, astenia	26	7	NEG	POS	POS	POS 1/80	POS	POS	NEG	NEG
9	M	28	Febre vespertina, linfadenopatia, cefaleia, mialgia, astenia, dispneia	15	17	NEG	POS	POS	POS 1/160	POS	POS	POS	POS 1/80
14	M	4	Febre vespertina, linfadenopatia,	13	13	NEG	POS	POS	INDET 1/40	POS	POS	POS	POS 1/80

			calafrio, edema facial										
28	M	48	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrios, mialgia, astenia	12	11	NEG	POS	POS	POS 1/160	POS	POS	POS	POS 1/80
29	M	23	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrios, mialgia, astenia	30	-	-	POS	POS	POS 1/160	POS	POS	-	-
34	F	35	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrio, cefaleia, mialgia, dispneia, dor torácica, edema dos membros inferiores, edema facial	16	7	NEG	POS	INDET	POS 1/160	INCONC	INCONC	NEG	NEG
38	F	41	Febre vespertina, linfadenopatia, mialgia, astenia, edema MII, edema facial	7	-	-	-	POS	POS 1/80	-	-	-	-
Pacientes sem critérios diagnósticos: achados clínicos E vínculo epidemiológico E testes negativos													
30	M	0.8	Febre	16	22	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
31	F	11	Febre, linfadenopatia, astenia	13	-	-	POS	NEG	NEG	-	-	NEG	NEG

35	F	78	Febre vespertina, linfadenopatia, calafrios, mialgia, astenia, tosse, dispneia, edema facial, dor abdominal	11	22	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-
36	F	63	Febre vespertina, linfadenopatia, astenia, tosse	15	16	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

ID, número de identificação do paciente; M, masculino; F, feminino; PCR, reação em cadeia da polimerase; ELISA, imunoenensaio enzimático; HAI, inibição da hemaglutinação; IFI, imunofluorescência indireta; POS, positivo; NEG, negativo; INDET, indeterminado; INCONC, inconclusivo.