

---

*Resumo*

## Associação de métodos para detecção de *Trypanosoma cruzi* em alimentos

**Elaine Cristina de Mattos; Vera Lucia Pereira-Chioccola (orientadora)**

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil – 2017.

---

### RESUMO

A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 6 a 8 milhões de pessoas no mundo. Embora a transmissão por triatomíneos esteja controlada, outras formas de transmissão têm mantido a infecção, sendo responsáveis pela introdução da doença de Chagas em países não endêmicos. Portanto, a doença de Chagas, atualmente, é um problema de saúde pública mundial. No Brasil, a transmissão oral tem se destacado, sendo que a polpa de açaí e o caldo de cana são os alimentos mais envolvidos em surtos. A dificuldade de isolamento de parasitas em alimentos não tem permitido a análise epidemiológica desses episódios. O objetivo do presente estudo foi padronizar um método laboratorial de detecção de *T. cruzi* em alimentos. Para atingir este objetivo estudamos as seguintes estratégias: i. padronização da PCR convencional (cPCR) e em tempo real (qPCR) para a determinação de *T. cruzi* em polpa de açaí e caldo de cana; ii. avaliação da sementeira de alimentos infectados em meio de cultura LIT a fim de aumentar a carga parasitária potencializando a sua detecção na PCR; iii. estudo da viabilidade e a integridade de *T. cruzi* em alimentos a fim de determinar o tempo ideal para realizar as análises em alimentos infectados; iv. aplicação da técnica de pesquisa de sujidades leves para detecção de fragmentos dos triatomíneos como indicador da contaminação. Todos os ensaios foram realizados em amostras de polpa de açaí e caldo de cana infectadas com diferentes concentrações de *T. cruzi* (cepa Y). Os resultados revelaram que o procedimento ideal para pesquisa de *T. cruzi* em polpas de açaí e caldo de cana consistiu em: i. centrifugação do alimento; ii. extração de DNA com kit comercial para matriz fezes e; iii. qPCR utilizando iniciadores específicos para *T. cruzi*. A cPCR se mostrou também eficiente para detecção do parasita em alimentos, sendo os limites de detecção de  $1 \times 10^1$  e  $1 \times 10^2$  tripomastigotas nos sedimentos de polpa de açaí e caldo de cana, respectivamente. A sementeira em meio LIT dos alimentos infectados experimentalmente não foi eficiente para aumentar a carga parasitária. Os testes de viabilidade mostraram que os tripomastigotas mantiveram-se viáveis nas amostras de caldo de cana por mais de 24 horas, mas na polpa de açaí os parasitas sobreviveram por até 8 horas. As técnicas para pesquisa de sujidades leves permitiram a recuperação e caracterização dos fragmentos de triatomíneos, como indicador da contaminação por *T. cruzi*. Estes dados dão subsídios para concluir que a qPCR padronizada para detecção de *T. cruzi* em amostras de alimentos poderá atender a demanda de diagnóstico dos surtos de infecção oral de doença de Chagas aguda, juntamente com a pesquisa de sujidades leves, contribuindo para o esclarecimento dos casos e como suporte para as ações de vigilância em saúde.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Trypanosoma cruzi*, análise de alimentos, surtos de doenças, doença de Chagas, Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

*Abstract*

## Association of methods for *Trypanosoma cruzi* detection in food

Elaine Cristina de Mattos; Vera Lucia Pereira-Chioccola (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil – 2017.

---

### ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects approximately 6 to 8 million people worldwide. Although triatomine bug transmission is controlled, other forms of transmission have maintained the infection and are responsible for introduction of Chagas disease in non-endemic countries. Therefore, Chagas disease is currently a global public health problem. In Brazil, oral transmission has been prominent. Acai pulp and sugarcane juice are the foods most frequently involved in outbreaks. The difficulty to isolate parasites in food has not allowed the epidemiological analysis of these episodes. The objective of the present study was to standardize a laboratory method for the detection of *T. cruzi* in food. To achieve this goal, we studied the following strategies: i. standardization of the conventional PCR (cPCR) and real time (qPCR) to determine *T. cruzi* in acai pulp and sugarcane juice; ii. evaluation of seeding of infected food in LIT culture medium in order to increase the parasite load, thus enhancing its detection in PCR; iii. *T. cruzi* viability and integrity studies in food to determine the ideal time to perform analyses in infected foods; iv. application of light filth analysis for the detection of triatomine bug fragments as an indicator of contamination. All assays were performed on acai pulp and sugarcane juice samples infected with different concentrations of *T. cruzi* (strain Y). Results revealed that the ideal procedure for *T. cruzi* screening on acai pulp and sugarcane juice consisted of: i. centrifugation of food; ii. DNA extraction with commercial kit for stool matrix and; iii. qPCR using specific primers for *T. cruzi*. The cPCR was also efficient to detect the parasite in food, with detection limits of  $1 \times 10^1$  and  $1 \times 10^2$  trypomastigotes in the acai pulp and sugarcane juice sediments, respectively. Seeding in LIT media of experimentally infected foods was not efficient to increase parasite load. Viability tests showed that trypomastigotes remained viable in the cane juice samples for more than 24 hours, but in the acai pulp the parasites survived for up to 8 hours. The techniques to investigate light filth allowed the recovery and characterization of triatomine bug fragments as an indicator of *T. cruzi* contamination. These data support the conclusion that the standardized qPCR to detect *T. cruzi* in food samples could meet the demand for diagnosis of outbreaks of oral infection of acute Chagas disease, together with the investigation of light filth, thus contributing to the clarification of cases and working as a support for health surveillance actions.

**KEYWORDS:** *Trypanosoma cruzi*, food analysis, outbreaks, Chagas disease, real time polymerase chain reaction.