

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS**

MARLON CEZAR COMINETTI

**ECOEPIDEMIOLOGIA DA ENTOMOFAUNA TRIATOMINAE (HEMIPTERA:
REDUVIIDAE) E DISTRIBUIÇÃO POPULACIONAL DAS DISCRETAS UNIDADES
DE TIPAGEM (DTU) DE *Trypanosoma cruzi* EM MATO GROSSO DO SUL,
BRASIL**

**CAMPO GRANDE
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS**

MARLON CEZAR COMINETTI

**ECOEPIDEMIOLOGIA DA ENTOMOFAUNA TRIATOMINAE (HEMIPTERA:
REDUVIIDAE) E DISTRIBUIÇÃO POPULACIONAL DAS DISCRETAS UNIDADES
DE TIPAGEM (DTU) DE *Trypanosoma cruzi* EM MATO GROSSO DO SUL,
BRASIL**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina “Dr. Hélio Mandetta”, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Professor Doutor Renato Andreotti.

**CAMPO GRANDE
2015**

FOLHA DE APROVAÇÃO



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)



Ata de Defesa de Tese Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias Doutorado

Aos vinte e oito dias do mês de setembro do ano de dois mil e quinze, às treze horas e trinta minutos, no Anfiteatro II, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Renato Andreotti e Silva (EMBRAPA), Carla Cardozo Pinto de Arruda (UFMS), Anamaria Mello Miranda Paniago (UFMS), Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval (UFMS), Ana Rachel Oliveira de Andrade (IESVAP) para julgar o trabalho do aluno: **MARLON CEZAR COMINETTI**, CPF 87838311187, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**ECOEPIDEMIOLOGIA DA ENTOMOFAUNA TRIATOMINAE (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) E DISTRIBUIÇÃO POPULACIONAL DAS DISCRETAS UNIDADES DE TIPAGEM (DTU) DE Trypanosoma cruzi EM MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**". O presidente da Banca Examinadora, Renato Andreotti e Silva, declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações como orientador. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dr. Renato Andreotti e Silva

Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda

Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago

Dra. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval

Dra. Ana Rachel Oliveira de Andrade

Dra. Sonia Maria Oliveira de Andrade (Suplente)

ASSINATURA

AValiação

	<u>aprovado</u>
<u>Carla Cardozo Pinto de Arruda</u>	<u>aprovado</u>
<u>Anamaria Mello Miranda Paniago</u>	<u>aprovado</u>
<u>Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval</u>	<u>aprovado</u>
<u>Ana Rachel Oliveira de Andrade</u>	<u>aprovado</u>
<u>Sonia Maria Oliveira de Andrade</u>	<u>aprovado</u>

RESULTADO FINAL:

☒ Aprovação

☐ Aprovação com revisão

☐ Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Orientador

Aluno

UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
CONFERE COM O ORIGINAL
28/09/15

Torquato Nascimento
Matrícula nº 04837238
PPGDI/UFMS

AGRADECIMENTOS

Ao findar mais uma etapa de minha vida, não posso deixar de fazer uma declaração de amor Àquele que sempre esteve ao meu lado, mesmo que muitas vezes não o tenha desejado. Apesar de saber que o meio acadêmico possa ser avesso ao Seu Nome, como poderia eu, tão abençoado, desprezá-Lo? Como poderia concluir mais uma fase de meu crescimento sem quem não existo? De que adiantaria toda uma vida de conquistas, honra, prazer, dinheiro, fama e tudo mais que o mundo pode dar se não tivesse Sua companhia, Seu amor, Seu carinho e Seu cuidado tão gentil e terno? Assim como creio piamente que em seis dias, literais, fez os céus, a terra, tudo que neles há e no sétimo dia, o sábado, descansou, creio que nada do que sou agora poderia ser sem o Senhor, meu Deus.

Como posso deixar de ver Sua mão poderosa me encaminhando ao meu orientador, Dr. Renato Andreotti, que teve a amabilidade de me orientar desde o momento em que eu nada sabia sobre pesquisa. Foi a Sua escolha nesse momento que me fez aprender muitas coisas, mais que apenas sobre pesquisa. Ao Senhor eu sou grato por tão querida pessoa que me é o Dr. Renato, a quem eu tenho muita estima e apenas pensamentos bons a seu respeito. Tivemos algumas dificuldades e por vezes fiquei chateado com ele, mas o aprendizado e proteção dispensados por ele foram tão grandes que qualquer coisa negativa fica ofuscada e apenas os pensamentos bons ficaram.

Por acaso é coincidência que a Jéssica é minha esposa tão amada hoje? É coincidência que a paciência e o amor que somente ela, da maneira dela, poderia me dar para ajudar a superar tão difíceis momentos durante esses quase quatro anos? Não. Foi o Senhor quem a colocou em meu caminho e, além do meu amor por ela, por amor ao Senhor é que eu desejo que ela esteja ao meu lado em toda essa vida e por todo a eternidade, após Seu retorno para nos buscar.

Tantas pessoas boas que conheci durante meu mestrado e doutorado no DIP que é impossível não ver que foi o Senhor quem me levou até eles. Professora Sônia que me ensinou (e teve muita paciência corrigindo) meus projetos. A professora Beth e toda a equipe de seu laboratório que sempre se dispuseram a me ajudar com os tripanosomas. Ao Rodrigo e Robson que me ensinaram muita coisa sobre biologia molecular no laboratório da Embrapa. A Barbara que me ajudou tanto quando já não estava no laboratório. São muitos mais que poderia nomear, mas sei que o Senhor sabe quem são essas pessoas e, de coração, peço que as abençoe grandemente.

Quando me apresentou a Dona Guiomara, nunca imaginei que ela poderia ser tão querida e atenciosa. Assim como todos que trabalham com ela no laboratório da secretaria de controle de vetores, foram de importância indescritível para minha conquista. Guarde-os em paz e alegria.

Como o Senhor me socorreu apresentando pessoas de outras instituições que me ajudaram tanto, como a Dra. Marta Teixeira e sua orientada, Luciana. Foi a Sua mão que as conduziu até meu encontro e a única coisa que posso dizer é obrigado.

Furnas do Dionísio. Comunidade tão querida para mim e por quem tenho sempre pensamentos de paz e amor. Dona Ceci que sempre foi minha amiga e apoiadora no local, que a senhora seja grandemente abençoada, bem como todos da comunidade.

Tantas coisas boas em um período tão curto da vida. Como o Senhor foi bom para comigo. Não sei como descrever como estou feliz e agradecido por tudo. É maior que o meu peito pode suportar.

Sei que o Senhor me ama, posso ver isso em minha vida e, por isso, confiantemente, desejo a todo aquele que participou desse meu trabalho, direta ou indiretamente, que “o Senhor te abençoe e te guarde; o Senhor faça resplandecer o seu rosto sobre ti e te conceda graça; o Senhor volte para ti o seu rosto e te dê paz” (Números 6:24-26) e que “a graça do Senhor Jesus Cristo, o amor de Deus e a comunhão do Espírito Santo sejam com você” (2 Coríntios 13:14).

Fortis cadere, cedere non potest.

Um homem corajoso pode cair, mas não pode se render.

Provérbio latino.

RESUMO

Este trabalho decorre do estudo ecoepidemiológico da entomofauna Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) e distribuição populacional das unidades discretas de tipagem (DTU) de *Trypanosoma cruzi* em Mato Grosso do Sul, Brasil. Foi analisado o conteúdo intestinal de 515 triatomíneos, utilizando-se microscopia óptica e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de *Trypanosoma cruzi*. As amostras positivas para o parasito, proveniente de 12 triatomíneos, foram submetidas a uma segunda PCR, cujo alvo era o gene cromossômico TcSC5D, seguido da técnica de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) com enzimas de restrição HpaI e SphI, clonagem e sequenciamento do amplificado. Em uma segunda etapa foram analisados, a partir de dados secundários, 14.178 espécimes de insetos vetores de *T. cruzi* capturados em 50 municípios de Mato Grosso do Sul em um período de nove anos e a influência de fatores climáticos, como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação, sobre sua frequência. Observou-se que a PCR foi mais precisa na identificação do parasito que o exame de microscopia (19,6% e 11,3%, respectivamente). Foram identificadas três unidades discretas de tipagem (DTU): TcI (58,34%), TcII (33,33%) e TcBat/TcVII (8,33%). A espécie mais frequente no estado é *Triatoma sordida* (96,22%) e a maioria dos espécimes foi coletada em peridomicílio (85,06%). Verificou-se que a frequência desses insetos foi afetada por fatores climáticos como temperatura e umidade relativa do ar, sendo esta última a mais influente. Este trabalho aponta que os dados oficiais das taxas de infecção natural dos triatomíneos podem estar subestimados em todo o estado, apresenta a distribuição de três linhagens de *T. cruzi*, sendo que esse é o primeiro relato de infecção natural por TcBat/TcVII em triatomíneos e que as características climáticas ao longo do ano devem ser observadas pelas equipes de controle de vetores. Tais achados podem subsidiar programas de controle do vetor, propiciando a otimização dos recursos destinados às ações de prevenção e controle da transmissão vetorial de *T. cruzi* em Mato Grosso do Sul.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*, DTU, ecoepidemiologia, triatomíneos, PCR

ABSTRACT

This work stems from eco-epidemiological study of entomofauna Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and population distribution of discrete typing units (DTU) of *Trypanosoma cruzi* in Mato Grosso do Sul, Brazil. Intestinal content of 515 triatomine was analyzed using optic microscopic and the Polymerase Chain Reaction (PCR) for identification of *Trypanosoma cruzi*. The samples positive for the parasite, from 12 triatomine, were subjected to a second PCR, whose aim was chromosome's gene TcSC5D followed of technique of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) with restriction enzymes HpaI and SphI, cloning and sequencing of the amplified. In a second stage were analyzed, based on secondary data, 14,178 specimens of *T. cruzi* vectors captured in 50 municipalities of Mato Grosso do Sul in a nine years period and the influence of climatic factors such as temperature, relative humidity air and precipitation on their frequency. It was observed that PCR was more precise identification of the parasite than microscopic optic (19.6% and 11.3%, respectively). Three discrete typing units (DTU) were identified: TcI (58.34%), TcII (33.33%) and TcBat/TcVII (8.33%). The most frequent species in the state is *Triatoma sordida* (96.22%) and most specimens were collected in peridomicile (85.06%). It was found that the frequency of these insects was affected by climatic factors such as temperature and relative humidity, the latter being the most influential. This work points out that the official data rates of natural infection of triatomine may be underestimated throughout the state, shows the distribution of three strains of *T. cruzi*, first report of natural infection per TcBat/TcVII in triatomine, and the climatic characteristics during the year shall be observed by vector control teams. Such findings can subsidize the program vector control, allowing the optimization of resources for prevention and control of vector-borne transmission of *T. cruzi* in Mato Grosso do Sul.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, DTU, ecoepidemiology, triatomine, PCR

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Doença de Chagas	12
2.1.1 Transmissão	14
2.1.2 Doença de Chagas em Mato Grosso do Sul	17
2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
2.2.1 Ciclo Evolutivo	22
2.3 Vetores	23
2.4 Hospedeiros vertebrados	27
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivos gerais	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Tipologia	34
4.2 Área de Estudo	34
4.3 Fauna triatomínea	34
4.4 Exames moleculares	35
4.4.1 Identificação do parasito	35
4.4.2 Identificação das DTU de <i>T. cruzi</i>	35
4.4.3 Sequenciamento	36
4.5 Variáveis climáticas	37
4.6 Análise da entomofauna	37
4.7 Estatísticas	37
5. RESULTADOS	38
5.1 Artigo I	39
5.2 Artigo II	43
5.3 Artigo III	51
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77

INTRODUÇÃO

A diminuição da biodiversidade está intimamente associada com o aumento da incidência de doenças, principalmente as transmitidas por vetores. Esse impacto gera paisagens hiperdinâmicas com consequências imprevisíveis para a saúde como um todo.

A frequente redução dos espaços silvestres, bem como as variações climáticas ao longo do tempo, pode levar a mudanças em habitats onde antes viviam animais, forçando-os a migrar para o refúgio mais próximo, inclusive espaços rurais e/ou urbanos. Muitos desses animais são, ou poderão se tornar, reservatórios ou vetores de patógenos que acometem o homem. Entre os animais invertebrados, insetos são vetores de parasitos e podem acompanhar o movimento do homem quando seu habitat é modificado pela ação antrópica. A dinâmica espacial desses invertebrados pode servir como ferramenta no entendimento da distribuição de um determinado parasito, o que se configura como boa estratégia no controle de uma zoonose ou antropozoonose.

Dentre essas antropozoonoses, pode-se destacar a doença de Chagas que tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*. Amplamente distribuído pela América Latina, o seu principal vetor é um inseto hematófago reduvídeo que costuma viver em ambiente silvestre podendo, entretanto, encontrar abrigo em construções artificiais próximas ao homem.

Apesar de já ter sido comemorado o centenário da descoberta do parasito, ciclo evolutivo, hospedeiros e vetores, muito há ainda para ser estudado, principalmente no que se refere à distribuição dos diferentes tipos de *T. cruzi*. A ampliação do conhecimento dessas informações contribuirá para mais eficiente controle preventivo da transmissão.

Em Mato Grosso do Sul, o maior número de casos da doença de Chagas está entre a população alóctone e de áreas rurais. As formas clínicas indeterminada, cardíaca, digestiva e mista foram identificadas entre autóctones e alóctones. Hoje, o estado é considerado livre de transmissão vetorial por *Triatoma infestans*, mas outras espécies de triatomíneos estão ocupando seu lugar na cadeia de transmissão do *T. cruzi*.

Compreender como técnicas mais sensíveis e precisas na identificação de parasitos, variáveis ambientais, distribuição de vetores e diferenças parasitárias

genotípicas, será de grande ajuda no entendimento de questões que envolvam a manutenção do agente etiológico no ambiente, na forma mais adequada de controlar sua dispersão e, futuramente, na aplicação do tratamento mais adequado aos acometidos pela parasitose. Todas essas variáveis implicam em melhora na condição de saúde da população, redução de gastos com tratamento dos doentes e ampliação de políticas voltadas para o controle vetorial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma das mais importantes infecções parasitárias na América Latina, sendo superada apenas pela malária. Mais de 10 milhões de pessoas estão infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida da família Trypanosomatidae. A doença é uma zoonose complexa, com mamíferos como reservatórios ou hospedeiros naturais (MILES; FELICIANGELI; ARIAS; 2003). A área endêmica da América do Sul compreende os seguintes países: Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Brasil, Bolívia, Chile, Uruguai. Ocorre também nos países da América Central (GUHL; SCHOFIELD, 1996).

A doença de Chagas pode ser dividida em fases aguda e crônica. A fase aguda pode ser assintomática (em torno de 95% dos casos) ou sintomática. Caracteriza-se por um quadro febril, com alta parasitemia e de curta duração, podendo variar de alguns dias a cerca de dois meses. Podem ocorrer manifestações clínicas leves como febre, sonolência, fadiga muscular, diarreia, edema e taquicardia, desaparecendo espontaneamente os sintomas. Nesta fase, as lesões são principalmente em resposta à ruptura das células hospedeiras pelo *T. cruzi*. Raramente é letal, apenas quando ocorrem severas miocardite e meningoencefalite (REY, 2008).

A fase crônica pode levar ao desenvolvimento de doença sintomática, apesar de se apresentar assintomática na maioria das vezes, podendo durar anos ou até décadas. Em 94,5% dos casos os sintomas são cardíacos e em 4,5% dos casos ocorrem megassíndromes do aparelho digestório apesar da baixa parasitemia - ambos os sintomas relacionados a lesões no sistema nervoso simpático e parassimpático (REY, 2008; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006).

Apesar da variabilidade de sintomas e as diferenças geográficas na distribuição das apresentações clínicas serem atribuídas principalmente à diversidade genética entre as populações do parasito, as características genéticas do hospedeiro humano e fatores ambientais provavelmente desempenham um papel importante (BUSCAGLIA; di NOIA, 2003; MACEDO *et al.*, 2004; MARTINS, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Além disso, distintos clones de uma mesma cepa podem apresentar tropismo por diferentes tecidos como cardíaco, muscular, plexo mesentérico do

esôfago e reto, entre outros (MACEDO *et al.*, 2004; MOREL *et al.*, 1980). Também podem ser vistas diferentes populações de *T. cruzi* associadas ao coração e esôfago de um único paciente (VAGO *et al.*, 2000).

A maior parte dos pacientes com manifestações severas, miocardite e megassíndromes, vive em áreas endêmicas do Cone Sul como Chile, Argentina, Bolívia, Uruguai, Paraguai e Brasil - exceto na Amazônia. Os isolados desses pacientes têm sido, em sua maioria, caracterizados como TcIIb (TcII). As mesmas características clínicas causadas por TcIIId (TcV) e TcIIe (TcVI) têm ocorrido principalmente na Bolívia e Paraguai (BARNABE *et al.*, 2001; VIRREIRA *et al.*, 2006).

Apesar da ausência de megassíndromes, pacientes chagásicos infectados com TcI podem apresentar formas clínicas severas. As taxas de mortalidade na fase aguda, na Venezuela, México e Panamá são elevadas (AÑEZ; CRISANTE; ROJAS, 2004; MILES *et al.*, 1981a; SALAZAR *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2006).

No Brasil, TcI tem sido associada a infecções rurais com a maioria dos casos agudos ocorrendo na Amazônia (AGUILAR *et al.*, 2007). A fase aguda que ocorre nessa região apresenta sintomas muito variáveis e pode ser grave, se não fatal, caso não seja tratada rapidamente (PINTO; VALENTE; VALENTE, 2004; XAVIER *et al.*, 2006).

Foi demonstrada a presença de TcI em casos com forma cerebral da doença em pacientes HIV positivos na Colômbia (BURGOS *et al.*, 2005). No Brasil, os pacientes estavam infectados por TcII (LAGES-SILVA *et al.*, 2001).

Na Bolívia, a maioria dos isolados de pacientes com megacólon foi caracterizada como TcIIId (TcV) e com raros casos associados a TcIIb (TcII) (VIRREIRA *et al.*, 2006). No Brasil, casos de megacólon foram associados a Z2 e TcII (FREITAS *et al.*, 2005; LAGES-SILVA *et al.*, 2006; LAURIA-PIRES; BOGLIOLO; TEIXEIRA, 1996; LUQUETTI *et al.*, 1986).

São pouco conhecidas as formas clínicas em pacientes infectados com Z3 (TcIII) com apenas casos assintomáticos comprovados na Amazônia. A forma cardíaco-digestiva crônica foi associada a Z3 (TcIII) no Equador (GARZÓN *et al.*, 2002).

Para a doença de Chagas não existe vacina e os medicamentos disponíveis para o tratamento são tóxicos para o paciente e sua eficácia é variável: até 80% de cura parasitológica na fase aguda; aproximadamente 60% de cura na fase crônica

recente em crianças de 12 anos, ou menos, e melhora clínica em adultos na fase crônica (WHO, 2012).

2.1.1 Transmissão

Inicialmente uma enzootia silvestre, transformou-se em uma antroponose com a intrusão do homem no ambiente natural no qual circulava o *T. cruzi*. A ocupação desorganizada dos espaços silvestres, fez com que se estabelecessem novos ciclos de transmissão. O homem e os animais domésticos passaram a fazer parte da cadeia epidemiológica da doença de Chagas devido à sua suscetibilidade ao *T. cruzi* e à proliferação de triatomíneos nas habitações, com possibilidade de intercâmbio do parasito entre o ciclo doméstico e silvestre (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2004) podendo existir, inclusive, independentemente desse último (FERNANDES *et al.*, 1994).

Um importante exemplo é a região amazônica. Embora não considerada área endêmica até poucos anos, vem apresentando um crescente número de casos. Nesta região, o *T. cruzi* está iniciando seu ciclo peridomiciliar devido, principalmente, a ação antrópica sobre a área de floresta pressionando os vetores do parasito, os triatomíneos, a se dispersarem e iniciarem o ciclo domiciliar (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2004). O ambiente mais seco gerado pelas modificações climáticas e decréscimo da quantidade de chuvas também têm favorecido a adaptação dos triatomíneos na região (VALENTE; VALENTE; FRAIHA NETO, 1999).

Apesar de todas as medidas de controle tomadas e a redução da infecção pela forma vetorial, a doença ainda é um grave problema de saúde pública (COURA, 2007; DIAS, 2006; DIAS; PRATA; CORREIA, 2008; SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006), não necessariamente por estar se alastrando, mas sim por apresentar uma história natural de caráter crônico e poucas manifestações clínicas na fase aguda, sendo raramente percebida pela população sob risco. Isso também implica na falta de prioridade política quanto à prevenção e estudos mais acurados (SILVEIRA, 2011).

A transmissão é principalmente vetorial e acontece através da penetração do parasito no hospedeiro pela pele lesionada ou mucosa. Outras vias de transmissão são a transfusional, congênita, por transplantes de órgãos, infecção por ingestão do protozoário em alimentos contaminados, contaminação por secreções das glândulas

anais de gambás (*Didelphis marsupialis*) e ingestão de animais infectados que possuem as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas tissulares. (DIAS, 2006; PINTO *et al.*, 1980). Dados recentes apontam para o decréscimo da via de transmissão transfusional no Brasil (DIAS *et al.*, 2008).

A forma oral de transmissão, considerada a via mais importante para os animais silvestres que se infectam ingerindo vetores e reservatórios com os parasitos, tem se tornado comum entre humanos. Devido aos surtos ocorridos principalmente na região Amazônica (NOBREGA *et al.*, 2009) e alguns pontuais em Santa Catarina (STEINDEL *et al.*, 2008), Paraíba (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991) e Bahia (DIAS *et al.*, 2008) a via oral é considerada a principal forma de infecção pelo *T. cruzi* na atualidade, especialmente após o controle do *T. infestans* - o principal vetor no ambiente doméstico - e a adoção de medidas preventivas nas transfusões de sangue (AGUILAR *et al.*, 2007; COURA *et al.*, 2002).

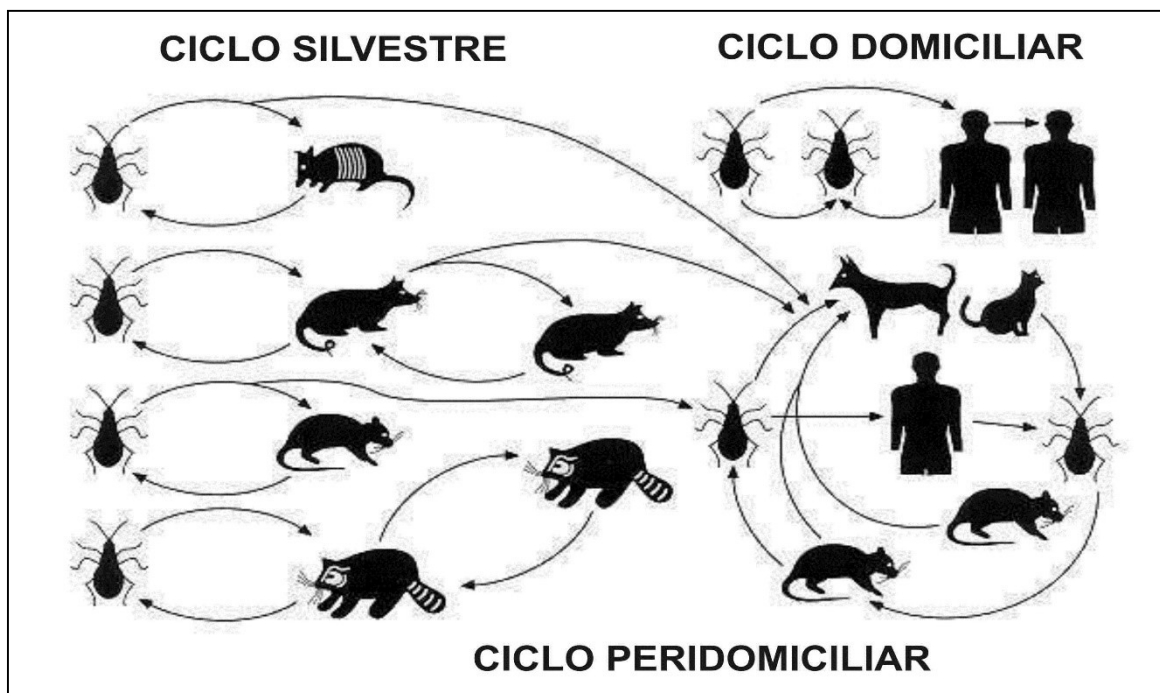
A principal característica nos casos de infecção oral é a severidade da doença, com muitos casos resultando em morte. As infecções orais em humanos ocorrem quando estes consomem produtos frescos contaminados pelo *T. cruzi*. As microepidemias que ocorreram nos estados do Pará e Amazonas estão associadas com o consumo do fruto do açazeiro (AGUILAR *et al.*, 2007; COURA *et al.*, 2002), uma palmeira típica da região amazônica. Nos casos de Santa Catarina e Paraíba a contaminação se deu através do consumo do extrato líquido da cana de açúcar (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991; STEINDEL *et al.*, 2008). Em ambos os casos, provavelmente devido aos triatomíneos infectados terem sido triturados junto com os frutos do açazeiro ou o caule da cana-de-açúcar.

No caso da Bahia atribuiu-se a transmissão à água contaminada com as fezes do barbeiro (DIAS *et al.*, 2008).

Epidemiologicamente podem ser descritos três ciclos de transmissão vetorial de *T. cruzi* (Figura 1). O silvestre, no qual estão envolvidos somente mamíferos silvestres e triatomíneos que não se adaptaram ao domicílio, o ciclo doméstico, quando há estreita interação do homem, animais domésticos e triatomíneos domiciliados e sobrepondo esses dois ciclos encontra-se o peridoméstico. Esta sobreposição ocorre principalmente por meio de animais sinantrópicos que visitam ou mesmo fazem seus ninhos no peridomicílio, triatomíneos silvestres que eventualmente se aclimatam aos ecótopos artificiais (COURA *et al.*, 2002) ou mesmo

animais domésticos que costumam caçar nos refúgios florestais próximos às residências.

Figura 1 – Ciclos silvestre, domiciliar e peridomiciliar de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de Rodrigo Zeledón (1996).

No Brasil evidencia-se a influência de aspectos socioeconômicos relacionados à origem e manutenção da transmissão vetorial, uma vez que a população frequentemente atingida pertence a classes menos favorecidas com pouca ou nenhuma qualidade de vida (VINHAES; DIAS, 2000).

Apesar dos esforços empreendidos na tentativa de erradicar essa doença no Brasil e em outros países do Cone Sul, a manutenção do ciclo silvestre da doença impede que tal objetivo seja atingido. Tem-se trabalhado com a perspectiva de controlar a transmissão - principalmente em áreas endêmicas da doença - eliminando os focos domésticos e peridomésticos dos vetores, maior vigilância em bancos de sangue e, mais recentemente, controle na preparação de alimentos derivados de palmeiras e cana-de-açúcar (DIAS, 2006; DIAS; PRATA; CORREIA, 2008; VINHAES; DIAS, 2000).

2.1.2 Doença de Chagas em Mato Grosso do Sul

Os primeiros trabalhos realizados sobre a doença em Mato Grosso do Sul, registram a presença dos vetores *Panstrongylus megistus* e *Triatoma sordida* nas unidades domiciliares de vários municípios do estado (NEIVA; PINTO, 1923). Trabalhos posteriores mostraram a presença de *P. geniculatus* (FORATTINI, 1960; TRAVASSOS; FREITAS, 1942), *Psammolestes coreodes*, *Rhodnius pictipes* e *T. sordida* na região do Salobra (TRAVASSOS; FREITAS, 1943).

No período de 1975 a 1979 na região de Fátima do Sul, MS, foram identificados casos humanos e detectada soroprevalência de 3%. Em biótopos naturais foram estudados reservatórios domésticos (3,3%) e silvestres (3,0%). Em relação aos vetores, foram encontradas as espécies *T. sordida*, *R. neglectus* e *P. geniculatus*, além da presença de *Triatoma infestans* - naturalmente infectado nos domicílios rurais (SILVA, 1979).

Em um inquérito sorológico nacional realizado no período 1975-1980, o estado de Mato Grosso do Sul apresentou um índice de 2,64% de chagásicos enquanto para o Brasil o valor era de 4,2% (CAMARGO *et al.*, 1984).

O *T. infestans* começou a ser capturado a partir da década de 1970, porém sempre em baixa densidade e frequentemente no intradomicílio. A presença de *T. infestans* foi constatada em 38 dos 50 municípios do estado, perfazendo 76% dos municípios investigados (SILVEIRA; FEITOSA; BORGES, 1984). A partir da década de 1980 houve a expansão do Programa de Controle da Doença de Chagas em Mato Grosso do Sul e em 1992 foi implantado o Programa de Eliminação do *Triatoma infestans* (PETi) que reduziu a presença do vetor para apenas 23 municípios (OPA, 1992). Após a conclusão dos trabalhos em 1995, Mato Grosso do Sul recebeu certificação de Estado Livre do Vetor em Domicílios pela Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) (COURA, 2003). Atualmente o Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) está orientado à vigilância das espécies secundárias de vetores (BRASIL, 2000).

Almeida *et al.*, (2008) mostraram que *T. sordida* foi a espécie mais abundante (13.102 exemplares ou 95,8% do total) seguida por *R. neglectus* (415 exemplares), *P. geniculatus* (51 exemplares) e *T. williami* (29 exemplares). No mesmo trabalho, apenas *P. geniculatus* (3,2%), *R. neglectus* (0,6%) e *T. sordida* (0,1%) apresentaram positividade para *T. cruzi*.

Outras espécies encontradas – apenas 74 exemplares - pelo Núcleo de Vigilância Entomológica do Estado foram: *P. megistus*, *T. baratai*, *T. brasiliensis*, *T. matogrossensis*, *T. vanda*, *R. pictipes*, *P. diasi* e *P. guentheri* (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Em outros estudos realizados verificou-se a predominância de casos alóctones, principalmente em pacientes de áreas rurais, com baixa escolaridade e com antecedente de contato com os triatomíneos (BORGES-PEREIRA *et al.*, 2001; POMPILIO *et al.*, 2005).

Sobre a morbidade encontra-se somente o estudo de Pompilio *et al.*, (1998) no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul no período de 1986-1996 no qual foram registradas as formas clínicas indeterminada, cardíaca, digestiva e mista, entre casos autóctones e alóctones.

Estudo realizado no pantanal sul-mato-grossense por Herrera *et al.*, (2008b) mostrou a presença de *T. cruzi* em quatis (*Nasua nasua*) em uma taxa de infecção de 32,1% para TcII, 28% para TcI e 7,1% para Z3 (TcIII). Morcegos também foram incriminados como reservatório do parasito (MARCILI *et al.*, 2009c). Entre os animais domésticos, o cão tem sido apontado como hospedeiro do flagelado. Trabalhos no estado mostraram que este animal é um importante reservatório do *T. cruzi* (TcIII), o que é preocupante devido a sua proximidade com o homem (MARCILI *et al.*, 2009c; UMEZAWA *et al.*, 2009).

2.2 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida da família Trypanosomatidae. Compreende populações heterogêneas de parasitas, que diferem em características biológicas: como comportamento em vertebrados e triatomíneos; patológicas: como virulência, mortalidade e tropismo celular; clínicas: apresentando as formas cardíaca e digestiva, com ou sem megasíndromes; além das características morfológicas, imunológicas e bioquímicas (COURA, 2007; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006).

A maioria dos estudos epidemiológicos e de estrutura populacional de isolados de *T. cruzi* está focada em isolados humanos e de triatomíneos, além de terem sido realizados em áreas endêmicas para doença de Chagas das Américas Central e do Sul. A estrutura populacional do parasito é predominantemente clonal, sugerindo raros

eventos de recombinação na natureza (TIBAYRENC *et al.*, 1993), apesar de existirem complexos processos sexuais em *T. cruzi* (GAUNT *et al.*, 2003).

Estudos enzimáticos têm sido utilizados para responder algumas questões referentes à heterogeneidade populacional do *T. cruzi*, às inter-relações dos ciclos de transmissão doméstico e silvestre e à taxonomia numérica (FERNANDES *et al.*, 1994).

Apesar do polimorfismo genético intraespecífico, análises de padrões de isoenzimas (enzimas com múltiplas formas que catalisam, essencialmente, a mesma reação) revelaram três grupos de isolados que foram classificados como zimodemas Z1, Z2 e Z3 (MILES *et al.*, 1977, MILES *et al.*, 1978).

Estudos posteriores utilizando marcadores baseados em sequências dos genes ribossômicos e de minixon (*spliced leader*) revelaram duas linhagens principais: *T. cruzi* I (Tcl) e *T. cruzi* II (TclI), que correspondem respectivamente aos zimodemas Z1 e Z2, e indicaram a existência de linhagens híbridas (Tcl/II) (DEVERA; FERNANDES; COURA, 2003; FERNANDES *et al.*, 1998a; MILES *et al.*, 1977; SOUTO *et al.*, 1996; TIBAYRENC *et al.*, 1993, ZINGALES *et al.*, 1999) Essas duas linhagens não comportaram Z3, posteriormente definido como Tcllc a partir de marcadores do gene de minixon (FERNANDES *et al.*, 1998b).

A linhagem Tcl, ainda, não foi dividida em sublinhagens. Entretanto, estudos recentes baseados em marcadores da região intergênica do gene de minixon demonstraram uma grande homogeneidade entre isolados de mesma região geográfica e significativo polimorfismo entre isolados de regiões geográficas diferentes (HERRERA *et al.*, 2008b; O'CONNOR *et al.*, 2007; SALAZAR; SCHIJMAN; TRIANA-CHÁVEZ, 2006). Estudos apontam que Tcl pode ser dividido em subpopulações (LLEWELLYN *et al.*, 2009, CURA *et al.*, 2010, GUHL, RAMIRES, 2011).

Apesar do grupo Tcl ser conhecido como silvestre, em países da América Central e Venezuela a infecção por essa linhagem é mais frequente em humanos (MILES *et al.*, 1981a). Nestes países, Tcl é transmitido ao homem em um ciclo doméstico que geralmente se justapõe ao ciclo silvestre porque *Rhodnius prolixus* - principal vetor - pode ser domiciliado e silvestre (MILES *et al.*, 1981a, 1981b; MILES; FELICIANGELI; ARIAS, 2003). Yeo *et al.* (2005) também observaram que Tcl está mais frequentemente associado a animais com hábitos arborícolas enquanto TclI a animais de hábitos terrestres.

A análise de sequenciamento de DNA mostrou que o grupo TcI é um clado relativamente homogêneo enquanto TcII – dividido em cinco subgrupos (a-e) - possui dois ou três cladogramas filogenéticos distintos (que equivalem a IIa-c) e duas linhagens híbridas (IId e IIe) que derivam a partir dos cladogramas dos subtipos IIb e IIc (BRISSE; VERHOEF; TIBAYRENC, 2001; COURA, 2003; DEVERA; FERNANDES; COURA, 2003; GAUNT *et al.*, 2003; MACHADO; AYALA, 2001; SILVA *et al.*, 2006). O sequenciamento de DNA também deu suporte às ideias de que TcIIa e TcIIc podem ser híbridos de TcI e TcIIb (YEO *et al.*, 2005).

Enquanto TcIIb e TcIIe ocorrem com maior frequência em ambientes antropizados do Brasil, Chile, Bolívia, Argentina, e TcIIId em ambientes antropizados do Chile e Bolívia, TcIIc e TcIIa possuem um ciclo de transmissão quase que exclusivamente silvestre (principalmente na Amazônia, Nordeste do Brasil, Paraguai e Argentina) (BARRETT *et al.*, 1980; CARDINAL *et al.*, 2008; CEBALLOS *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 1998a, 1998b; FREITAS *et al.*, 2006; GAUNT; MILES, 2000; MILES *et al.*, 1981b; POVOA *et al.*, 1984; YEO *et al.*, 2005; ZINGALES *et al.*, 1999).

Estudos mostram que a linhagem TcIIc, no ciclo silvestre, possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo no Brasil, Colômbia, Argentina e Paraguai apresentando associação com tatus e ecótopo terrestre. Além disso, essa linhagem foi encontrada em didelídeos terrestres do gênero *Monodelphis* no Norte e Nordeste do Brasil e no Paraguai (BARRETT *et al.*, 1980; GAUNT; MILES, 2000; MILES *et al.*, 1981b; POVOA *et al.*, 1984; YEO *et al.*, 2005). Também foi descrito TcIIc na Argentina em cangambás, um carnívoro terrestre que vive em tocas (CARDINAL *et al.*, 2008; CEBALLOS *et al.*, 2006). Cães domésticos também foram encontrados infectados por TcIIc no Paraguai, Argentina e Brasil (BARNABE *et al.*, 2001; CARDINAL *et al.*, 2008; MARCILI *et al.*, 2009c). Triatomíneos das espécies *Panstrongylus geniculatus* e *Triatoma infestans*, ambas de hábitos terrestres, são os vetores associados à TcIIc (BARRETT *et al.*, 1980; CARDINAL *et al.*, 2008; MARCILI *et al.*, 2009b; MILES *et al.*, 1981b; YEO *et al.*, 2005).

Apesar disso, apenas alguns casos humanos isolados foram relatados até o momento no Brasil (Estados do Amazonas, Pará e Minas Gerais) (FREITAS *et al.*, 2006; MILES *et al.*, 1981b). Também foi proposto que TcIIc seria uma terceira grande linhagem que, junto com TcI e TcIIb, formariam as linhagens ancestrais de *T. cruzi* (FREITAS *et al.*, 2006).

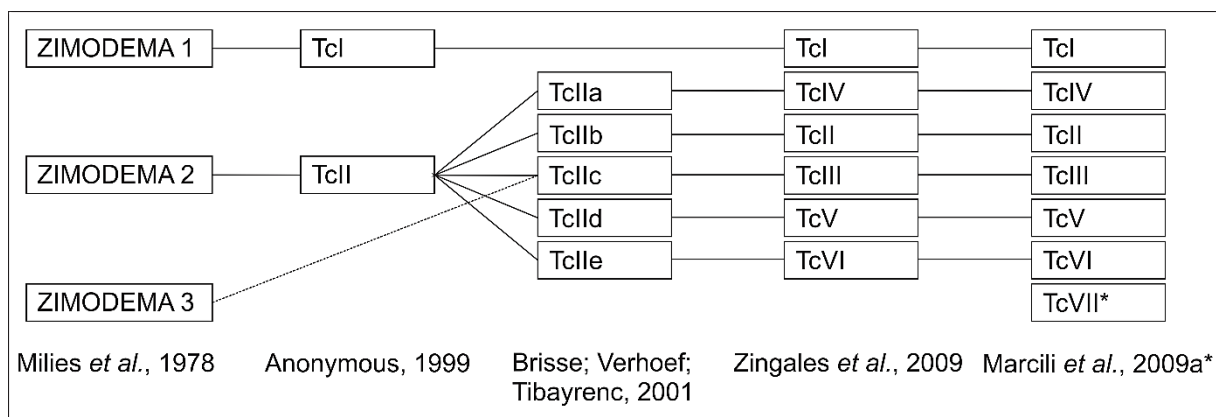
A maioria dos isolados de pacientes com manifestações severas genotipadas como TcIIb, TcIIId e TcIIe são provenientes de áreas endêmicas do Cone Sul, exceto Amazônia (MARCILI, 2008). Essas linhagens, por serem domésticas e peridomésticas, são transmitidas principalmente por triatomíneos domiciliados como *T. infestans* (BARNABE *et al.*, 2001; DIOSQUE *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2006; LAGES-SILVA *et al.*, 2006; SOLARI *et al.*, 2001; VALADARES *et al.*, 2008; VIRREIRA *et al.*, 2006; ZINGALES *et al.*, 1999).

Não há uma associação clara entre os isolados de TcIIa, seus ecótopos e seus hospedeiros mamíferos. Essa linhagem foi descrita em tatus e didelfídeos do gênero *Monodelphis*, porém, esses dados nunca foram confirmados por marcadores moleculares, sendo baseados unicamente em zimodemas (MILES *et al.*, 1981b). Também tem sido descrita em guaxinins, macacos e cães domésticos da América do Norte (BARNABE *et al.*, 2001; ROELLIG *et al.*, 2008).

Dedelphis sp., arborícolas sinantrópicos, já foram incriminados como reservatórios naturais de TcI. Entretanto, estudos recentes verificaram a presença de TcIIb nesses animais, tipo mais frequentemente encontrado em infecções humanas na região do Cone Sul. Primatas não humanos também já foram encontrados infectados com TcI e TcII (ARAUJO *et al.*, 2011; MARCILI *et al.*, 2009c).

A figura 2 mostra a classificação de *T. cruzi* segundo diversos autores e sua relação com a proposta apresentada por Zingales *et al.* (2009), dividindo *T. cruzi* em seis linhagens: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e o trabalho de Marcili *et al.*, (2009a) que identificou uma sétima linhagem classificada como TcBat ou TcVII.

Figura 2 – Nomenclatura de *Trypanosoma cruzi* de acordo com diferentes autores



T. cruzi é um parasito de grande diversidade genética que circula em uma grande variedade de mamíferos e espécies de insetos, mas as associações entre hospedeiros e distribuição geográfica das unidades discretas de tripagem (DTU) ainda não foram totalmente caracterizadas. Além disso, os ciclos de transmissão doméstico e silvestre do parasito podem se sobrepor em determinados locais, sendo mais complexo seu estudo (ARAUJO *et al.*, 2011).

As linhagens de *T. cruzi* são bem distribuídas ao longo de diferentes regiões. Trabalhos utilizando métodos bioquímicos demonstraram a relação entre sua heterogeneidade intraespecífica e sua complexidade nos ciclos de transmissão, entretanto, pouco se sabe se os subtipos do parasito diferem de acordo com o hospedeiro (ARAUJO *et al.*, 2011; MILES *et al.*, 1977).

Estudo sugere que TcIIc (TcIII) e TcIIId (TcV) tem uma maior faixa de distribuição sendo encontrados nas regiões de caatinga e cerrado (ARAUJO *et al.*, 2011).

2.2.1 Ciclo Evolutivo

Em seu ciclo evolutivo (Figura 3), *T. cruzi* apresenta três estágios principais: a forma amastigota, encontrada no interior de células do mamífero hospedeiro e com capacidade de multiplicação; a forma epimastigota, encontrada na parte posterior do tubo digestivo médio do inseto vetor e que também apresenta capacidade de multiplicação; e a forma tripomastigota, encontrada no tubo digestivo posterior do vetor e na circulação do hospedeiro mamífero, sem capacidade de multiplicação (REY, 2008).

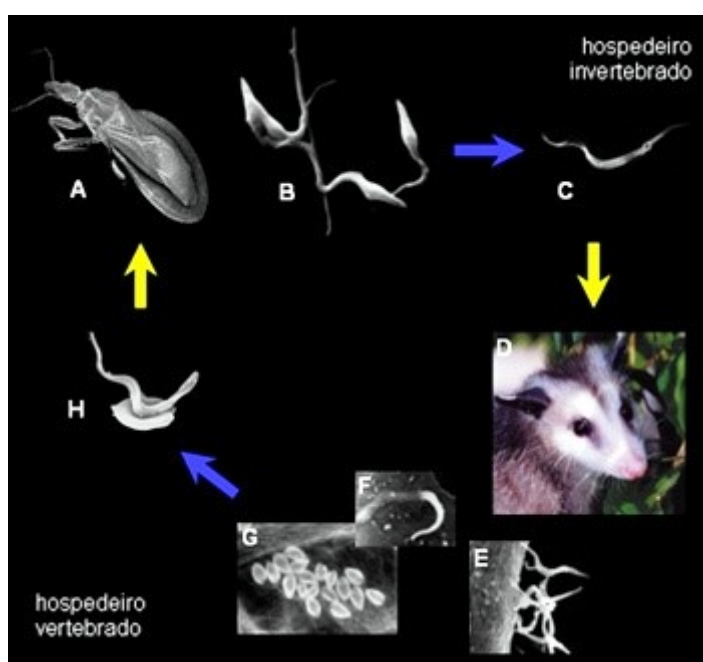
Quando o inseto faz o repasto sanguíneo em hospedeiro mamífero infectado ele ingere formas tripomastigotas sanguíneas que migram para a parte anterior do intestino médio do inseto. Ali sofrem diferenciação em formas epimastigotas que migram para a parte posterior do intestino médio onde conseguem se multiplicar. Acredita-se que a infecção no inseto dure toda a sua vida (REY, 2008).

Quando as formas epimastigotas do intestino médio migram para o intestino posterior do triatomíneo elas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, formas infectantes. O hospedeiro mamífero é infectado a partir das fezes do inseto. Os tripomastigotas invadem células do sistema fagocítico mononuclear onde se

transformam em amastigotas e se reproduzem por fissão binária no citoplasma (REY, 2008).

No interior celular, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que, após ruptura celular, caem na corrente sanguínea – momento em que podem ser ingeridos pelo vetor - ou podem invadir novos macrófagos ou outras células de diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro. Ao invadirem novas células, voltam à fase amastigota e novamente começam a se multiplicar.

Figura 3 - Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.



A. repasto sanguíneo em hospedeiro infectado com *T. cruzi*; B. diferenciação em epimastigotas; C. epimastigotas na ampola retal do inseto; D. hospedeiro vertebrado; E. penetração; F. nas células hospedeiras, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas; G. amastigotas; H. tripomastigotas sanguíneos.

Fonte: Fiocruz, 2012.

2.2 Vetores

Os invertebrados vetores do *T. cruzi* são os triatomíneos, insetos hemipteros da família Reduviidae. Caracterizam-se pela hematofagia obrigatória, tanto em machos como em fêmeas, desde a primeira fase de vida até a forma adulta. Possuem hábitos noturnos, fotofobia, termotropismo positivo e presença de substâncias anticoagulantes e anestésicas na saliva (SCHOFIELD, 1979).

Fora das Américas encontram-se o gênero *Linshcosteus* na Índia e as espécies próximas de *Triatoma rubrofasciata* que estão distribuídas em todas as regiões

tropicais (CARCAVALLO; JURBERG; LENT, 1997). Estudos filogenéticos sugerem que a subfamília Triatominae evoluiu independentemente nas Américas (SCHOFIELD, 2000).

Desde o início do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no país, a partir da década de 1950, e de sua sistematização e estruturação na forma de programa de alcance nacional a partir de 1975, de um total de 142 espécies agrupadas em cinco tribos formadas por 18 gêneros (GALVÃO *et al.*, 2003; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009), apenas três gêneros têm importância epidemiológica na transmissão do parasito - *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius* (GALVÃO *et al.*, 2003) - e não mais que quatro espécies estão diretamente relacionadas a cadeia de transmissão:

a) *Triatoma brasiliensis* - com larga distribuição no semiárido nordestino e encontrado exclusivamente entre rochas. Pode invadir ambiente doméstico, mas não o colonizar (CARCAVALLO; JURBERG; LENT, 1997).

b) *Panstrongylus megistus* - espécie comum no país e a primeira a ser estudada por Carlos Chagas. Epidemiologicamente, é um dos mais importantes vetores no Brasil, com altas taxas de infecção por *T. cruzi* (MILES *et al.*, 1978). É silvestre e encontrado na Amazônia onde insetos adultos foram observados nas residências. Também é comum na Bolívia, Colômbia e na Venezuela, onde tem sido sugerida como substituta de *Rhodnius prolixus*, outra espécie vetora (CARRASCO *et al.*, 2005).

c) *Triatoma pseudomaculata* - ocorre nos Estados de Pernambuco, Paraíba, uma parcela do Ceará, sertão de Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Piauí e Goiás (GONSALVES *et al.*, 1997). Podem invadir residências, mas não há registros de colônias formadas (LA FUENTE *et al.*, 2010).

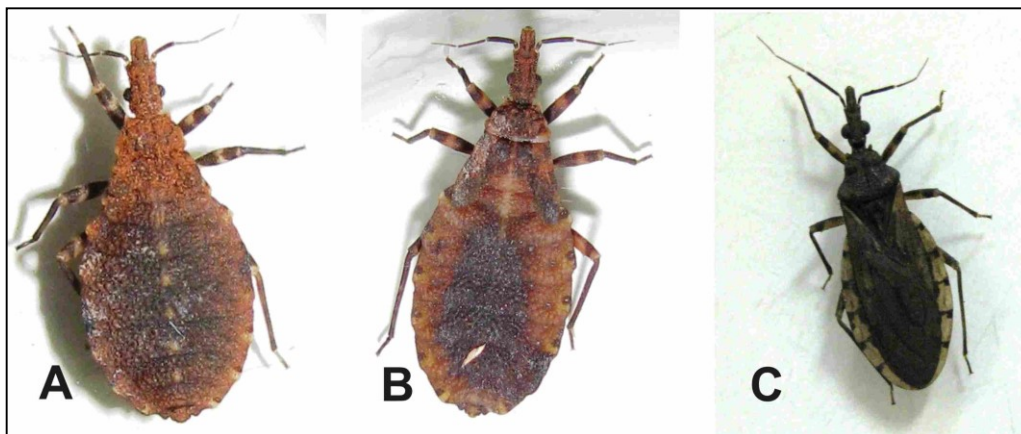
d) *Triatoma sordida* - espécie nativa do cerrado, incluindo as áreas de transição de Maranhão-Piauí, da Bahia, do pantanal e do Chaco Oriental (FORATTINI, 1980), é a mais frequente e a que apresentou maior número de indivíduos positivos para flagelados no estado de Mato Grosso do Sul (ALMEIDA *et al.*, 2008). Sua importância reside em ser predominantemente peridomiciliar, apresentar elevada expectativa de vida quando comparada a outros triatomíneos (PELLI *et al.*, 2007) e ser a espécie mais capturada no Brasil.

Apesar de *Triatoma infestans* não ter relação direta com a cadeia de transmissão do parasito no Brasil, sua importância histórica na cadeia epidemiológica do *T. cruzi* é indiscutível. Espécie que apresenta maior antropofilia e predominantemente doméstica, sua distribuição já foi muito ampla nas regiões

Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste restando apenas alguns focos de importância no nordeste do Estado de Goiás e sul de Tocantins, na região do Além São Francisco, na Bahia, no norte do estado Rio Grande do Sul e no sudeste do Piauí (VINHAES; DIAS, 2000). Em 2006, o Brasil recebeu a Certificação pela Interrupção da Doença de Chagas pelo *T. infestans* estando a espécie controlada em níveis que não sustentam a transmissão do agente etiológico (BRASIL, 2006). Até o momento, o único país com populações silvestres de *T. infestans* é a Bolívia (RICHER *et al.*, 2007).

No ambiente silvestre *T. sordida* costuma colonizar tocos e casca de árvores, topo de palmeiras, refúgios de gambás, tatus e roedores e estar relacionado com macacos e aves silvestres (CARCAVALLO *et al.*, 1997). Em ambiente doméstico é muito comum em galinheiros, pombais, currais e estábulos, podendo também ocupar rachaduras nos entrenós de cana de açúcar. Apesar de apresentar marcada ornitofilia, pode utilizar outras fontes de alimento quando seu ambiente é desfigurado e suas ofertas alimentares reduzidas (DIOTAIUTI *et al.*, 1993), levando-o a invadir domicílios ou anexos domiciliares quando estes simularem seus ecótopos naturais.

Figura 4 - *Triatoma sordida*.



A. ninfa de 4º estágio; B. ninfa de 5º estágio; C. adulto.
Fonte: COMINETTI (2010).

A espécie *T. sordida* (Figura 4) é encontrada com muita frequência no estado de Mato Grosso do Sul com taxa de positividade para *T. cruzi* variando de 0,1% (ALMEIDA *et al.*, 2008) a 18% (COMINETTI *et al.*, 2011). Entretanto, seja em domicílio ou anexos, a convivência com triatomíneos e mamíferos infectados aumenta a possibilidade da infecção humana (TOLEDO *et al.*, 1997).

Apesar de *T. sordida* não ser considerado um vetor eficiente, principalmente devido aos seus hábitos alimentares – ornitofílicos - e preferência peridomiciliar

(ALMEIDA *et al.*, 2008), é uma espécie que merece atenção uma vez que vários fatores devem ser considerados antes de se declarar uma espécie como eficiente vetor do *T. cruzi*. A capacidade de *T. sordida* colonizar tanto ecótopos artificiais como naturais – além de grande resistência às modificações ambientais (DIOTAIUTI *et al.*, 1993) - o torna importante vetor no ciclo peridoméstico, dificultando o controle do parasito.

Vale destacar as espécies *R. prolixus* e *T. dimidiata* entre os principais vetores na América Latina, sendo a primeira com alta prevalência na América Central, noroeste da América do Sul, oeste dos Andes e domiciliada na Colômbia e Venezuela; e a segunda distribuída desde o centro do México até o Peru, chegando à Guiana, ao leste (CARCAVALLO *et al.*, 1997).

De acordo com a importância epidemiológica as espécies de triatomíneos podem ser classificadas em três categorias:

a) predominantemente domiciliares - colonizam habitações humanas em alta densidade, são antropofílicas e apresentam altas taxas de infecção natural por *T. cruzi*, como *R. prolixus* e *T. infestans*. Podem ser encontradas também em ambiente silvestre, exceto *T. rubrofasciata*, encontrada exclusivamente em ambiente doméstico (REY, 2008).

b) semidomiciliares e peridomiciliares – costumam ser silvestres, mas invadem com frequência o ambiente doméstico podendo formar pequenas colônias. Espécies como *T. brasiliensis*, *P. megistus*, *T. sordida* e *T. pseudomaculata*, estão incluídas neste grupo (DIAS; DIOTAIUTI, 1998; NOIREAU *et al.*, 1999). *P. megistus* apresenta hábitos distintos conforme a região encontrada. No sul do Brasil é exclusivamente silvestre de Mata Atlântica e raramente é visto em domicílios. No interior do estado de São Paulo costuma colonizar galinheiros e outras construções peridomiciliares. Na Bahia, especialmente coloniza residências em plena zona urbana (REY, 2008).

c) estritamente silvestres – apesar de só transmitirem *T. cruzi* para o homem quando este invade os ecótopos selváticos, essas espécies mantêm os focos naturais da zoonose. Destacam-se espécies como *T. rubrovaria*, *T. vitticeps* e *R. domesticus*, assim como *P. geniculatus*, que vive associado a tocas de tatus e é encontrado em todas as áreas endêmicas da doença (REY, 2008).

Os principais mecanismos de adaptação dos triatomíneos a ecótopos naturais ainda não são bem compreendidos (ABADH-FRANCH *et al.*, 2008; NOIREAU *et al.*,

2000) e os padrões ecológicos de distribuição e preferências de cada espécie também necessitam de mais estudos (MARCILI, 2008).

Algumas espécies apresentam relação estreita com um ecótopo. *R. brethesi* é encontrado exclusivamente na palmeira *Leopoldina piassaba*. Outras espécies apresentam grande variedade de ecótopos, como *P. megistus* e *T. dimidiata*. Raramente os triatomíneos são encontrados em árvores. *T. infestans* e *T. sordida* são exceções. Suas populações ocorrem em regiões de elevada altitude onde habitam rochas e em regiões de várzea vivem em árvores (DUJARDIN *et al.*, 2000; GAUNT; MILES, 2000; NOIREAU *et al.*, 2000).

A descaracterização da cobertura vegetal silvestre, além da habilidade dos triatomíneos em se dispersarem por diferentes habitats (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2004), constituem fatores que afetam infestação e reinfestação por triatomíneos nas moradias com condições de abrigar populações desses insetos (FORATTINI, 1980).

Estudo entomológico demonstrou que espécies secundárias de triatomíneos aumentaram sua densidade nos domicílios e peridomicílios nos últimos anos indicando que a definição do papel primário ou secundário das diferentes espécies não pode ser um conceito geral, devendo-se considerar o potencial de domiciliação local da espécie e a pressão que as modificações ambientais possam acarretar ao processo de formação de colônias domiciliares (DIAS *et al.*, 1994).

Apesar dos esforços empreendidos no controle dos vetores domiciliados e semidomiciliados, a complexa relação entre vetores, hospedeiros silvestres, hospedeiros domésticos e o homem faz com que a doença de Chagas esteja longe de ser erradicada nas Américas.

2.4 Hospedeiros vertebrados

Mamíferos são hospedeiros de uma enorme gama de parasitos. Um grupo muito diverso de artrópodes adaptou-se a estes hospedeiros e muitos são importantes vetores de doenças (CHAVEZ, 2001).

No Bioma Cerrado ocorrem 194 espécies de mamíferos incluídos em 30 famílias e nove ordens, ficando em terceiro lugar em diversidade, perdendo apenas para Amazônia e Mata Atlântica, seguido pela Caatinga e Pantanal. Os maiores

grupos são os roedores e quirópteros, representados por 81 e 51 espécies, respectivamente (MARINHO-FILHO; RODRIGUES; JUAREZ, 2002).

A ordem Didelphimorphia compreende a grande maioria dos marsupiais americanos vivos, distribuídos do sudeste do Canadá ao sul da Argentina na altura da latitude 47°S. A família Didelphidae, a única dentro da ordem Didelphimorphia, é composta por 19 gêneros e 92 espécies atualmente reconhecidas, sendo que 16 gêneros e 55 espécies são encontrados no Brasil. A maioria das espécies é noturna e apresenta uma dieta onívora e/ou insetívora que pode incluir artrópodes, pequenos vertebrados, frutos e néctar (ROSSI; BIANCONI; PEDRO, 2006).

Dentro dessa família encontram-se importantes espécies do gênero *Didelphis* e *Philander*:

- a) *Didelphis albiventris* (gambá, raposa, saruê, seriguê, micurê) - a distribuição geográfica desta espécie inclui as porções leste e centro-oeste do Brasil, o Paraguai, o Uruguai, as regiões norte e central da Argentina e o sul da Bolívia (LEMOS; CERQUEIRA, 2002);
- b) *Didelphis aurita* (gambá, raposa, saruê, seriguê) - distribui-se na porção leste do Brasil, do estado de Alagoas a Santa Catarina, estendendo-se a oeste até o Mato Grosso do Sul, ocupando ainda o sudeste do Paraguai e a província de Misiones, na Argentina (BROWN, 2004; CERQUEIRA; LEMOS, 2000);
- c) *Didelphis imperfecta* (gambá, saruê, mucura) - encontra-se na Venezuela ao sul do rio Orinoco, sudoeste do Suriname, Guiana Francesa e extremo norte do Brasil (CERQUEIRA; LEMOS, 2000);
- d) *Didelphis marsupialis* (gambá, saruê, mucura) - possui ampla área de distribuição, que se estende do nordeste do México, até as regiões centrais do Brasil e da Bolívia (BROWN, 2004; CERQUEIRA; LEMOS, 2000);
- e) *Philander andersoni* (cuíca-de-quatro-olhos) – ocorre desde o sul da Venezuela, sul da Colômbia, leste do Equador, leste do Peru e extremo noroeste do Brasil (BROWN, 2004; PATTON; SILVA; MALCOLM, 2000);
- f) *Philander frenatus* (cuíca-de-quatro-olhos, gambá-cinza-de-quatro-olhos, cuíca-verdadeira) – em todo o leste brasileiro, dos arredores de Bahia, a Santa Catarina, estendendo-se a sudoeste em direção à porção sul do Paraguai e regiões próximas da Argentina (PATTON; COSTA, 2003);

g) *Philander mcilhennyi* (cuíca-de-quatro-olhos) - frequente na região amazônica do Peru central e oeste do Brasil, nos estados do Acre e Amazonas a leste do rio Madeira (PATTON; COSTA, 2003);

h) *Philander opossum* (cuíca-de-quatro-olhos) - com ampla área de distribuição que se estende do México, até o centro da Bolívia e do Brasil próximo ao estado do Mato Grosso do Sul (PATTON; COSTA, 2003).

Os membros da família Dasypodidae e dos gêneros *Didelphis* e *Philander* recebem maior atenção já que são considerados reservatórios naturais do *T. cruzi* (COURA; DIAS, 2009; LEGEY *et al.*, 2003; YEO *et al.*, 2005) e convivem muito próximos do homem e animais domésticos, exceto o gênero *Philander* que é exclusivamente silvestre.

Em seres humanos, bem como em animais domésticos e alguns roedores, o *T. cruzi* pode ser fatal nos estágios agudos da doença, mas em pelo menos 30% dos casos ela torna-se crônica. Entretanto, não foi observada patogenicidade severa em tatus (SCHOFIELD, 2000), gambás (DEANE; LENZI; JANSEN, 1984; FERNANDES *et al.*, 1998a) e cuícas (LEGEY *et al.*, 2003), sugerindo que esses animais têm relação parasito-hospedeiro bem equilibrada com *T. cruzi*, devido a processos evolutivos lentos e gradativos, o que não ocorre com o homem, já que o mesmo é recente nas Américas (SCHOFIELD, 2000).

Em gambás a relação é mais complexa. No lúmen das glândulas de odor de *D. marsupialis* é possível encontrar formas epimastigostas diferenciando-se em formas tripomastigostas metacíclicas do parasito, o que só era visto nos vetores (JANSEN *et al.*, 1999). Além disso, *D. marsupialis* pode controlar ou mesmo eliminar a infecção por *T. cruzi* fazendo manutenção das cepas sem qualquer lesão tecidual aparente (DEANE; LENZI; JANSEN, 1984) enquanto *P. opossum* pode manter até dois tipos de cepas diferentes (PINHO *et al.*, 1993 *apud* JANSEN *et al.*, 1999).

Fernandes *et al.* (1989) mostraram a importância de gambás na relação parasito-hospedeiro. As preocupações principais residem no fato desse animal ser comum em ambiente florestal e ao mesmo tempo sinantrópico, criando um elo entre o ambiente silvestre e o doméstico, além de se apresentar naturalmente (FERNANDES *et al.*, 1991) e experimentalmente (REY, 2008) infectado por formas epimastigotas e tripomastigotas em suas glândulas adanais, ter índices de infecção relativamente altos (FERNANDES *et al.*, 1991; GRISARD *et al.*, 2000; RAMIREZ *et al.*, 2002; SCHLEMPER *et al.*, 1985) e parasitemia patente de longa duração

(ZELEDÓN *et al.*, 1970). Além disso, gambás são apontados como filtros biológicos dos diferentes genótipos de *T. cruzi* (DEANE *et al.*, 1984; DVORAK *et al.*, 1988; MACEDO; PENA, 1998).

Cingulados da família Dasypodidae (ordem Xenarthra) são os que possuem maior número de espécies descritas. Sua geografia abrange desde o Chile e Argentina até o sul dos Estados Unidos da América (DEUTSCH; PUGLIA, 1990). Dentro dessa família pode-se mencionar os gêneros e espécies encontrados no Brasil: *Cabassous unicinctus* - tatupeba, tatu de rabo mole, papa defunto; *Cabassous chacoensis* e *Cabassous tatouay* - tatu de rabo mole; *Priodontes maximus* - tatu canastra, tatu gigante; *Euphractus sexcinctus* - tatu peludo, tatupeba; *Tolypeutes matacus* - tatu bola, mataco; *Tolypeutes tricinctus* - tatu bola, tatuapara; *Dasypus novemcinctus* - tatu galinha, tatuetê; *Dasypus septemcinctus* - tatu galinha, mulita.

Já foram encontrados três subgrupos de TcII em tatus. A caça e a utilização desses animais como alimento pode ter dado um impulso na transmissão do parasito. *Dasypus* sp e *E. sexcinctus* podem ser mantidos por certo tempo em cativeiro dentro das casas ou ao seu redor, podendo ser importantes fontes de transmissão de TcII para populações rurais, por gerarem oportunidades para infecção. *Dasypus* sp foi o primeiro hospedeiro a ser descrito por Carlos Chagas (YEO *et al.*, 2005).

O isolamento do TcIIa (MENDONCA *et al.*, 2002; POVOA *et al.*, 1984) a partir de seis tatus - associados ao triatomíneo vetor *P. geniculatus* - na floresta Amazônica levou a especulação de que tatus poderiam ser os principais hospedeiros de *T. cruzi* II (GAUNT; MILES, 2000) já que os hospedeiros naturais do TcII não estão claramente definidos (JANSEN *et al.*, 1999). Registros silvestres anteriores são esparsos (BRENIERE *et al.*, 1998; BARNABE *et al.*, 2001, LISBOA *et al.*, 2000; PINHO *et al.*, 2000; YEO *et al.*, 2005).

Ao norte e ao sul da bacia Amazônica é frequente o encontro de gambás com TcI, o que levou a considerar que esses animais e o grupo TcI têm uma história evolutiva muito próxima. *D. marsupialis*, *D. albiventris*, *D. virginiana*, *P. frenata* e *P. opossum* estavam, em sua grande maioria, infectados pelo grupo TcI, além de outros marsupiais e animais de hábitos arborícolas. Os grupos TcIIa e TcIIb também foram encontrados nesses animais, porém, em número muito inferior se comparado com TcI (YEO *et al.*, 2005).

A ordem Chiroptera constitui-se como a mais característica dos mamíferos, pois são os únicos a apresentar estruturas especializadas que permitem um voo verdadeiro

(ROSSI; BIANCONI; PEDRO, 2006). Tem sido dividida em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera, apesar de dados moleculares refutarem a monofilia de Microchiroptera (HUTCHEON; KIRSCH, 2006). A primeira é encontrada exclusivamente no Velho Mundo e compreende uma única família (Pteropodidae) com 42 gêneros e 185 espécies, enquanto a segunda está amplamente distribuída por todo globo, envolvendo 17 famílias, 157 gêneros e 928 espécies (SIMMONS, 2005).

Chiroptera apresenta longa história coevolutiva com tripanosomas (MOLYNEUX; STILES, 1991; STEVENS; GIBSON, 1999). Estudo mostra que morcegos podem abrigar mais de um genótipo, inclusive em infecções mistas. Capturas na região de Nhecolândia, Pantanal, mostraram *Phyllostomus hastatus* e *Artibeus jamaicensis* infectados com TcII e TcIII, às vezes apresentando coinfecção TcII e TcIII. TcI foi observado em *Epitesicus* sp., *P. hastatus* e *A. fimbriatus* (LISBOA *et al.*, 2008).

Cães têm sido apontados como principais animais domésticos hospedeiros de *T. cruzi*, apresentam grande capacidade de transmissão do parasito para triatomíneos, além de ser a única espécie a apresentar as mesmas características clínicas observadas em humanos (CRISANTE *et al.*, 2006; HERRERA *et al.*, 2005; MONTENEGRO *et al.*, 2002; REITHINGER *et al.*, 2005; SHADOMY; WARING; CHAPPELL, 2004; SOSA-JURADO *et al.*, 2004).

Trabalhos também mostram que porcos (*Sus scrofa*) podem ser hospedeiros do parasito (SALAZAR-SCHETTINO *et al.*, 1997; VALENTE, 1999; COMINETTI *et al.*, 2011).

Infecções laboratoriais em ratos a partir de cepas de *T. cruzi* isoladas de porcos no México mostraram-se mais virulentas e com a parasitemia se apresentando após seis dias da inoculação, enquanto que as inoculações com isolados de cães mostraram-se menos virulentas e parasitemia detectada após nono dia de inoculação (SALAZAR-SCHETTINO *et al.*, 1997).

Herrera *et al.* (2008a) encontraram em porcos monteiros elevada prevalência de *T. cruzi* (28,5% de 17 espécimes capturados) na região do Pantanal do Rio Negro, MS, Brasil. Os autores apontam as mudanças no ambiente silvestre como possível agente capaz de diminuir a resistência dos animais de vida livre a infecções por microrganismos patogênicos – entre eles o *T. cruzi* –, além desses mesmos animais participarem da manutenção do ciclo silvestre da doença quando em ambiente selvagem.

Tanto Herrera *et al.* (2008a) quanto Salazar-Schettino *et al.* (1997), relatam que os porcos estavam com aparência saudável e o xenodiagnóstico realizado por Salazar-Schettino *et al.* (1997) não mostrou positividade, apesar de ter sido isolado o parasito dos mesmos porcos. O estudo de Cominetti *et al.* (2011) também não mostrou o parasito na corrente sanguínea do animal. Isso leva a crer que esses animais se apresentam frequentemente na fase crônica da doença, caracterizada pela baixa parasitemia, o que dificulta o encontro de *T. cruzi* no sangue através de exames parasitológicos.

A presença de animais domésticos - principalmente galinhas e cães - vivendo ou dormindo próximos às residências influencia o número e infectividade dos triatomíneos (CATALÁ; CROCCO; MORALES, 1997).

Esses achados mostram a importância de se conhecer as peculiaridades das espécies hospedeiras, seus ecótopos e vetores associados, bem como até que ponto o impacto antrópico pode levar esses animais a se aproximarem das pessoas e fazerem parte do ciclo de transmissão do *T. cruzi* no ambiente domiciliar e peridomiciliar.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a ecoepidemiologia da entomofauna Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) e distribuição populacional das discretas unidades de tipagem (DTU) de *Trypanosoma cruzi* em Mato Grosso do Sul, Brasil.

3.2 Objetivos específicos

Para a consecução do objetivo geral foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) comparar as técnicas de exame microscópico e exame molecular como método para a detecção da infecção por *T. cruzi* nos triatomíneos capturados.
- b) detectar o *T. cruzi* por meio de exames parasitológicos, caracterizando-o por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
- c) identificar as unidades discretas de tipagem (DTU) de *T. cruzi* nos triatomíneos e sua distribuição no estado.
- d) descrever a entomofauna triatominae e verificar a influência de variáveis climáticas sobre sua distribuição no estado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipologia

Este estudo qualifica-se como quantitativo experimental, com coleta de dados primários e secundários.

4.2 Área de estudo

O Estado de Mato Grosso do Sul está localizado na região Centro-Oeste do Brasil e tem uma área de 357.145.532 km² com 79 municípios, uma população estimada de 2.619.657 habitantes, e uma densidade populacional de 6,86 habitantes/km² (BRASIL, 2015). Aproximadamente dois terços do estado são Cerrado, uma heterogênea savana florística que abrange mais de 2.000 km² e estende-se desde o Brasil Central para partes da Bolívia e do Paraguai (SIMON *et al.*, 2009). Na área ocidental do estado encontra-se o Pantanal, uma das mais ricas planícies do mundo, com abundância e diversidade de animais selvagens, além de habitats com um complexo mosaico de recursos (HARRIS *et al.*, 2005).

Faz fronteira a leste com os Estados de Minas Gerais e São Paulo, ao norte com os Estados de Mato Grosso e Goiás, ao sul com o Estado do Paraná e com o Paraguai e ao oeste com a Bolívia. Está dividido em nove Regiões de Planejamento (RP) conforme o Estudo da Dimensão Territorial do Estado de Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2015) que são: Bolsão, Campo Grande, Grande Dourados, Leste, Norte, Pantanal, Sudoeste, Sul-fronteira e Cone-Sul.

4.3 Fauna triatomínea

Os insetos foram coletados pelas equipes das unidades regionais da Coordenadoria de Controle de Vetores da Secretaria Estadual de Saúde (SES) do Estado de Mato Grosso do Sul (CCV-MS). O estado é dividido atualmente em cinco Núcleos Técnicos de Vetores, conforme estabelecido pela CCV-MS. Estes núcleos foram responsáveis pela coleta e identificação dos insetos, bem como pelos exames parasitológicos, ou seja, tanto exame a fresco como esfregaços em camada delgada. Após o exame, os triatomíneos recolhidos foram colocados em tubos contendo álcool

70% e enviados para a Unidade de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte para testes moleculares, como descrito por Cominetti *et al.* (2013).

Os triatomíneos foram identificados usando as chaves dicotômicas propostas por Carcavallo *et al.* (1997). Protozoários flagelados foram observados usando método descrito por Souza (1999).

5.4 Exames moleculares

4.4.1 Identificação do parasito

Foram realizadas extrações de DNA a partir do macerado de triatomíneos capturados e entregues pelas regionais do CCV-MS, como descrito por Westenberger *et al.* (2004). A integridade e quantificação das amostras seguiu como descrito por Cominetti *et al.* (2011).

A identificação do DNA do parasito nas amostras seguiu como descrito por Wincker *et al.* (1994). O esquema de amplificação usado foi descrito por Schijman *et al.* (2011).

Em condições naturais, triatomíneos são muitas vezes co-infectados com *T. cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. Portanto, as amostras também foram submetidas a PCR para *T. rangeli* usando os iniciadores TRF3 (5'-CCCCATACAAAACACCCTT-3') e TrR8 (5'-TGGAATGACGGTGCGGCGAC-3'), que têm como alvo a região subtelomérica conservada da espécie (SubTr, GenBank número de acesso AF426020). O protocolo de amplificação foi previamente descrito por Chiurillo *et al.* (2003).

4.4.2 Identificação das DTU de *T. cruzi*

Para a identificação das linhagens de *T. cruzi* (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e TcBat/TcVII), as amostras positivas foram submetidas a uma segunda PCR visando o gene TcSC5D (genoma CL-Brener loci: TcCLB.473111.10, TcCLB.507853.10). Para isso, os iniciadores TcSC5D-FWD (5'-GGACGTGGCGTTTGATTAT-3') e TcSC5D-rev (5'-TCCCATCTTCTTCGTTGACT-3'), que amplificam um fragmento de 832 pb, foram usados. O protocolo de amplificação foi descrito por Cosentino e Agüero (2012).

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Eppendorf AG 22331 e os controles de DNA (controle positivo para *T. cruzi* e *T. rangeli* e controle negativo, bem como controle para DTU - TcI-VI e TcBat/TcVII – eram provenientes do laboratório da Universidade de São Paulo (USP) e foram gentilmente fornecidos pela Dra. Marta M.G. Teixeira. Água ultrapura foi usada como controle negativo adicional.

As reações foram efetuadas com volume final de 25 µL contendo tampão de PCR 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; 50 mM de KCl), 1,5 mM MgCl₂, Os dNTP 0,2 mM, cada iniciador, 0.2pmol de 1U De Taq DNA polimerase (Platinum®, Invitrogen) e 20ng de DNA genômico.

Após eletroforese em gel de agarose (2%) e coloração com brometo de etídio, os produtos de amplificação foram visualizados sob luz UV.

Uma alíquota de 20-µL do produto amplificado do gene TcSC5D foi digerido em uma única reação com 1U de HpaI (R6305) e 1U de SphI (R6265) e aquecidos a 37°C por 1h. Todas as enzimas de restrição foram adquiridas a partir da Promega (Southampton, Reino Unido).

Os fragmentos de restrição resultantes foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) após eletroforese em gel de agarose (2%) e coloração com brometo de etídio.

O processo para a identificação das DTU seguiu o protocolo descrito por Cosentino e Agüero (2012).

4.4.3 Sequenciamento

O produto do gene TcSC5D amplificado foi purificado usando PureLink™ Kit (Invitrogen), seguido de clonagem no plasmídeo pGEM-Teasy (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado utilizando o método descrito por Sanger; Nicklen; Coulson (1977) em ABI 3730 DNA *Analyzer* (Applied Biosystems).

As reações de sequenciamento foram executadas utilizando o iniciador universal para sequenciamento T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3 ') e o kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing v3.1.

As corridas foram realizadas em tubos capilares de 36 cm, utilizando o polímero POP7. As sequências obtidas foram analisadas e as sequências de plasmídeo identificadas e removidas usando o software BioEdit (HALL, 1999). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências da base de dados do *GenBank* e

pesquisa usando o BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi realizada para determinar a sequência identificada (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Análises filogenéticas foram realizadas utilizando o pacote de *software Geneious* v.4.8.5 (Biomatters) (DRUMMOND *et al.*, 2009).

4.5 Variáveis climáticas

Foram calculadas as médias de Temperatura (T), Umidade Relativa do AR (UR) e Precipitação (P) em milímetros (mm), com dados obtidos na base de dados da Estação da Embrapa Agropecuária Oeste (BRASIL, 2015), para meses (janeiro a dezembro) e para anos (2006 a 2014).

4.6 Análise da entomofauna

Para avaliar a entomofauna de triatomíneos vetores de *T. cruzi* do Estado de MS, analisaram-se dados secundários em bancos de dados que contêm informações do programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) desenvolvido pela Coordenadoria de Controle de Vetores (CCV) no período de 2006 a 2014 em 50 municípios. Foi determinada a distribuição mensal e anual das espécies de triatomíneos, índice de infecção natural e análise faunística das classes de abundância, constância, frequência e dominância (THOMAZINI; THOMAZINI, 2002).

4.7 Estatística

Para verificar a relação entre os triatomíneos coletados com as Regiões de Planejamento, ecótopo, positividade e frequência das espécies ao longo de meses e anos foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman. Para verificar a influência dos elementos climáticos sobre a frequência dos insetos vetores e sua distribuição ao longo das regiões de planejamento foi utilizada a análise de regressão linear múltipla. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software SPSS*, versão 20.

5 RESULTADOS

Como os resultados se referem aos quatro objetivos específicos, eles são apresentados a seguir sob a forma de artigos.

O primeiro artigo, intitulado “Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil”, publicado no periódico Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, traz uma comparação entre a técnica para identificação do *T. cruzi* em triatomíneos utilizada oficialmente pela Secretaria de Saúde do Estado de Mato Grosso do Sul e a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O segundo artigo, intitulado “Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil”, publicado no periódico Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, identifica as DTU de *T. cruzi* em triatomíneos e sua distribuição em Mato Grosso do Sul.

No terceiro artigo, intitulado “Entomofauna triatominae (Hemiptera: Reduviidae) em Mato Grosso do Sul, Brasil, e influência de elementos climáticos sobre na estrutura de suas populações”, a ser enviado ao periódico PLOS Neglected Tropical Diseases, é apresentada a entomofauna Triatominae em Mato Grosso do Sul e correlacionada sua frequência com elementos climáticos.

5.1 Artigo I



Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 46(3):277-280, May-Jun, 2013
http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0024-2013

Major Article

Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil

Marlon Cezar Cominetti^[1], Robson Ferreira Cavalcante de Almeida^[1], Guilmaria Maria do Amaral Gonçalves^[2] and Renato Andreotti^[3]

[1]. Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.
[2]. Laboratório Regional de Entomologia, Núcleo Regional de Saúde, Secretaria de Estado de Saúde, Campo Grande, MS. [3]. Sanidade Animal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Gado de Corte, Campo Grande, MS.

ABSTRACT

Introduction: The aim of the present study was to assess the polymerase chain reaction (PCR) as a method for detecting *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines that had been previously determined by microscopic examination in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Methods:** In total, 515 specimens were collected. Material from the digestive tract of each triatomine was analyzed for the presence of *T. cruzi* by microscopic examination and PCR using the 121/122 primer set. **Results:** Among the 515 specimens tested, 58 (11.3%) were positive by microscopy and 101 (19.61%) were positive by PCR and there was an association between the results of the techniques ($\chi^2 = 53.354$, $p = 0.001$). The main species of triatomine identified was *T. sordida* (95.5%) **Conclusions:** The use of PCR in entomological surveillance may contribute to a better assessment of the occurrence of *T. cruzi* in triatomine populations.

Keywords: Epidemiology. Triatomine infection monitoring. Polymerase chain reaction. Microscopy examination. *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is a protozoan belonging to the order Kinetoplastida and the Trypanosomatidae family. *T. cruzi* is the causative agent of Chagas disease and is transmitted by triatomines, which are Hemiptera insects of the Reduviidae subfamily that are characterized by hematophagy (both males and females) from juvenile to adult stages¹.

Among the 138 described species of triatomines, only four play a direct role in the epidemiology of the parasite²: *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa and Espínola, 1964) and *Triatoma sordida* (Stal, 1859). In a recent study of Triatominae in the State of Mato Grosso do Sul (MS), *T. sordida* was frequently found to be parasitized by flagellate protozoa.³ In the same study, the presence of three major species of triatomines was confirmed in MS: *T. brasiliensis* (Neiva, 1911), *P. megistus* (Burmeister, 1835) and *T. sordida* (Stal, 1859). Infestation rates for domiciliary and peridomestic areas

were only significant for *Triatoma sordida* (9.3% and 86.6%, respectively), whereas *T. brasiliensis* and *P. megistus* exhibited less than 0.2% infestation³.

T. cruzi in triatomines is identified using optical microscopy and material extracted from the digestive tract of the insect. Although this method is inexpensive and widely used, various drawbacks have been reported, particularly in relation to sensitivity and specificity^{4,5}.

The aim of the present study was to evaluate the frequency of infection with *T. cruzi* in triatomines in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil using polymerase chain reaction (PCR) and microscopic examination (ME).

METHODS

Study area

Insects were collected in the municipalities of Jaraguari (May to August 2009 and September 2011), Rochedo, Caarapó, Douradina, Antônio João, Dourados, Terenos, São Gabriel do Oeste, Aparecida do Taboado, Paranaíba, Rio Verde de Mato Grosso, Corumbá, Miranda and Aquidauana (August 2011 to November 2012) in the State of Mato Grosso do Sul (Figure 1) using the method described by Cominetti et al.

Triatomine identification and microscopic examination

Triatomines were identified using the dichotomous keys proposed by Carcavallo et al. Flagellated protozoa were detected using the method described by Souza.

Address to: Dr. Marlon Cezar Cominetti. Lab. Biologia Molecular/Sanidade Animal/EMBRAPA Gado de Corte. Avenida Rádio Maia, Vila Popular, 79106-550 Campo Grande, MS, Brasil.

Phone: 55 67 3368-2173

e-mail: mcminetti@gmail.com

Received 5 February 2013

Accepted 12 June 2013

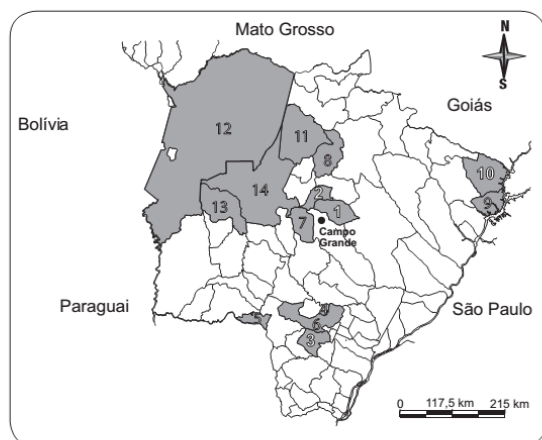


FIGURE 1 - Map of the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, highlighting municipalities where insects were captured. 1: Jaraguari; 2: Rochedo; 3: Caarapó; 4: Douradina; 5: Antônio João; 6: Dourados; 7: Terenos; 8: São Gabriel do Oeste; 9: Aparecida do Taboado; 10: Paranaíba; 11: Rio Verde de Mato Grosso; 12: Corumbá; 13: Miranda; 14: Aquidauana.

DNA extraction and PCR

Genomic deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted from the insects as described by Westenberger et al. The integrity of the DNA sample was determined using 0.8% agarose gel electrophoresis, staining with ethidium bromide (0.5 µg/ml) and visualization under ultraviolet light. Additionally, one glass slide containing material from the digestive tract of the insects was analyzed. After the fixed material was scraped from the slide, DNA extraction was performed as described above.

The following primers described by Wincker et al¹⁰ were used for molecular identification of *T. cruzi*: 121 (5'-AAATAATGTACGGG (T/G) GAGATGCATGA-3') and 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3'). This set of primers allows the amplification of 330 bp of kDNA from *T. cruzi*¹⁰. The amplification scheme utilized was previously described by Schijman et al. Under natural conditions, *T. cruzi* and *Trypanosoma rangeli* frequently co-infect triatomines. Therefore, the samples were also subjected to PCR for *T. rangeli* using the primers TrF3 (5'-CCCCATACAAAACACCCTT-3') and TrR8 (5'-TGGAATGACGGTGCGGCGAC-3'), which target a conserved subtelomeric region in *T. rangeli* (SubTr, GenBank accession number: AF426020). The amplification profile utilized was previously described by Chiurillo et al. All amplification reactions were performed on an Eppendorf AG 22331 thermocycler. Control DNA (*T. cruzi* as positive and *T. rangeli* as negative) was kindly donated by Dr. Marta M.G. Teixeira (Universidade de São Paulo, Brazil). Furthermore, ultrapure water was used as an additional negative control.

The reactions were performed in a final volume of 25 µl containing 1X PCR buffer [10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl], 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP mix, 5pmol of each primer, 1U of *Taq* DNA polymerase (Platinum®, Invitrogen) and 20ng of genomic DNA.

The amplification products were visualized under ultraviolet light after electrophoresis on an agarose gel (2%) and staining with ethidium bromide.

Statistical analysis

The results were compared using the chi-squared test (χ^2) with a significance level of 5%. Statistical analysis was performed using MedCalc 12.4.0.0.

RESULTS

In total, 515 samples were analyzed. Among the samples, 58 (11.3%) were positive for flagellated protozoa as determined by optical microscopy, and 101 (19.6%) were positive for *T. cruzi* as determined by PCR.

The main species of triatomine identified was *T. sordida*, which represented approximately 95.5% of the specimens collected, thus confirming the findings of Almeida et al. The frequency of *T. cruzi* infection in this species was 10.7% when assessed by microscopy and 18.1% when assessed by PCR.

Association was found between the results obtained by the techniques ($\chi^2 = 53.354$, $p = 0.001$) (Table 1) and the number of positive samples by PCR was higher than by ME.

PCR was the only technique that has found *T. cruzi* in triatomines in the municipalities of Rochedo, Corumbá, Aquidauana and Terenos (Table 2), since ME only confirms the cases in which the parasite is visible in the test, and the PCR also identifies the parasite in samples where this was not seen.

Reactions using primers for *T. rangeli* (data not shown) produced no overlapping data, thereby confirming that the amplicons were specific to *T. cruzi*.

TABLE 1 - Comparison of the results obtained by PCR and microscopy in triatomines from the municipalities of Mato Grosso do Sul, Brazil.

ME	PCR		
	positive	negative	total
Positive	58	0	58
Negative	43	414	457
Total	101	414	515

ME: microscopic examination; PCR: polymerase chain reaction.

DISCUSSION

In Brazil, measures to control triatomine populations are enacted after the detection of insect outbreaks² and involve the use of insecticides in the infested areas. This practice has been effective for many years^{13,14}. Microscopic examination of material from the digestive tract of the insects is routinely performed to monitor the distribution of flagellate protozoa (possibly *T. cruzi*). However, microscopy does not permit

TABLE 2 - Triatomines positive for *T. cruzi* by PCR and microscopy in municipalities of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil.

City	Species	Positive		
		n*	ME	PCR
Jaraguari	<i>T. sordida</i>	260	45	76
Rochedo	<i>T. sordida</i>	64	-	3
Caarapó	<i>P. megistus</i>	1	1	1
	<i>P. geniculatus</i>	4	-	1
Douradina	<i>T. sordida</i>	1	-	-
Miranda	<i>T. sordida</i>	7	-	-
Terenos	<i>T. sordida</i>	48	-	1
Rio Verde de Mato Grosso	<i>T. sordida</i>	17	-	-
Aparecida do Taboado	<i>T. sordida</i>	54	10	10
São Gabriel do Oeste	<i>T. matogrossensis</i>	8	-	-
Paranaíba	<i>T. sordida</i>	22	-	-
Dourados	<i>P. megistus</i>	1	**	1
Antônio João	<i>T. sordida</i>	1	-	-
Aquidauana	<i>T. matogrossensis</i>	9	2	5
	<i>T. sordida</i>	12	-	2
	<i>Rhodnius</i> sp.	1	-	-
Corumbá	<i>T. sordida</i>	5	-	1
Total		515	58	101

*number of triatomines captured; ** inconclusive; ME: microscopic examination; PCR: polymerase chain reaction; *P.*: *Panstrongylus*; *T.*: *Triatoma*.

the accurate identification of *T. cruzi* because other species of trypanosomes are morphologically indistinguishable from *T. cruzi*, thereby generating false-positive results. Furthermore, microscopy does not detect the presence of the flagellates in triatomine as PCR, evidenced in the present study.

Advantages of PCR over ME with respect to sensitivity have been reported for *T. cruzi*¹⁴, *Acanthamoeba* spp.¹⁵, *Plasmodium* spp.¹⁶, *Babesia* spp.¹⁷, *Trypanosoma evansi*¹⁸ and *Leishmania* spp.¹⁹. Advantages related to specificity have also been reported²⁰. Furthermore, PCR is more efficient than ME for the detection of *T. cruzi* in *Triatoma infestans* feeding on patients with Chagas diseases, with a difference of 46% between PCR and ME²⁰. Previous studies have reported differences of 34.9% (*Rhodnius prolixus*), 14.5% (*Triatoma dimidiata*)²¹ and 24.6% (*T. infestans*)⁵ between PCR and ME. In the present study, the difference between the techniques (with respect to the frequency of positive results) was 8.4%. Although this value is lower than that of previous studies, PCR still exhibited highest number of triatomines infected by *T. cruzi* than ME.

A combination of PCR and optical microscopy to monitor *T. cruzi* in triatomines may ensure better results in terms of the presence of the parasite, as shown by the results in the municipalities of Rochedo, Dourados, Corumbá, Aquidauana and Terenos. However, considering the true sensitivity and specificity of microscopic examination, questions may arise

regarding the current distribution of flagellated protozoa among triatomines, e.g., what is the true distribution of the parasite among triatomines?

In the present study, the proportion of false-negative results in microscopic examination was approximately 8.2%. Considering this issue and taking the data published by Almeida et al. regarding the frequency of triatomines positive for *T. cruzi* by ME in the State of Mato Grosso do Sul as an example, the number of insects positive for the parasite should be 724 (8.2%) rather than 15 (0.2%) found by Almeida et al. Similar or higher values have been reported in other studies comparing these techniques^{4,5,20,21}, which demonstrates that the PCR results may be different from the results reported by the current official surveys. Additionally, results obtained from first- and second-stage nymphs using ME are underestimated because of the difficulty in obtaining feces during these stages. This difficulty does not exist when PCR is performed⁵.

In the municipality of Dourados, ME was performed using fixed material on a microscope slide that was previously classified as inconclusive for *T. cruzi*. Inconclusive results in ME may be caused by parasite deformation during preparation on the microscope slide, which hinders the identification of the protozoan. In the present study, the identity of the flagellated protozoa found by microscopy was confirmed by PCR, which demonstrates the effectiveness of this tool, particularly with respect to controversial points that may arise during the identification process. Other studies have shown that PCR may detect the DNA of parasites on microscope slides even years after preparation^{22,23}.

False-positive results are a potential problem with PCR when used for identification of *T. cruzi*²⁴. To reduce the possibility of false-positive results, a negative control was used in the present study. In addition, the different steps of the technique were performed in different rooms.

Although the epidemiological importance of ME is clear in terms of disease control, the use of sensitive techniques, such as PCR, can increase the accuracy of the epidemiological investigation and enable the optimal allocation of financial resources. Furthermore, PCR may be used in epidemiological surveys of other agents of public health importance without significant additional implementation costs.

The frequency of capture of *T. sordida* was higher than that of the other triatomines, which confirms the results of previous entomological surveys in which this species was frequently found^{3,14,25,26}. Although previous studies have reported a low rate of *T. cruzi* infection^{2,3,25}, the present study suggests that these values may be underestimated and that PCR is essential as a tool for detection in official surveys.

Clearly, one detection technique does not exclude the other. The utilization of ME and PCR in combination contributes greater efficacy in identifying outbreaks of the parasite and also a more accurate mapping of its distribution.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the *Laboratório Regional de Entomologia, Núcleo Regional de Saúde, Secretaria de Estado de Saúde* for their assistance and Dr. Marta M.G. Teixeira (*Universidade de São Paulo, Brazil*) for the generous gift of *T. cruzi* and *T. rangeli* genomic DNA.

FINANCIAL SUPPORT

Embrapa Gado de Corte, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) and Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect-MS). PhD scholarship provided by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*.

REFERENCES

- Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos, 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica, 7th ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
- Almeida PS, Ceretti Júnior W, Obara MT, Santos HR, Barata JM. Survey of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) fauna in domestic environments and natural infection by Trypanosomatidae in the State of Mato Grosso do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41:374-380.
- Braz LMA, Raiz R, Amato Neto V, Alárcon RS, Gakya E, Okay TS. The detection of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: comparison of a PCR-based assay with microscopical examination. Ann Trop Med Parasitol 2007; 101:461-465.
- Pizarro JC, Lucero DE, Stevens L. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector, *Triatoma infestans*: high rates found in Chuquisaca, Bolivia. BMC Infect Dis 2007; 7:66.
- Cominetti MC, Andreotti R, Oshiro ET, Dorval ME. Epidemiological factors related to the transmission risk of *Trypanosoma cruzi* in a Quilombola community, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2011; 44:576-581.
- Carcavallo RU, Rodrigues MEF, Galvão C, Rocha DS, Girón IG, Arocha MAO, et al. Habitats e fauna relacionada. In: Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, editors. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1997. p. 107-244.
- Souza MA. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94:205-210.
- Westenberger SJ, Sturm NR, Yanega D, Podlipaev SA, Zeledón R, Campbell DA, et al. Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. Parasitology 2004; 129:537-547.
- Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples patients in a rural endemic area. Am J Trop Med Hyg 1994; 51:771-777.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Jaramillo AMM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5:e931.
- Chiurillo MA, Crisante G, Rojas A, Peralta A, Dias M, Guevara P, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10:775-779.
- Silveira AC. Current situation with Chagas disease vector control in the Americas. Cad Saude Publica 2000; 16:35-42.
- Peñaranda-Carrillo R, Moreira EF, Silveira AC, Leite J, Vinhaes MC, Castro C, et al. Evaluation of the impact of vector control programs through serological testing in Mambai/Buritópolis, Goiás State. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35:331-338.
- Yera H, Zafir O, Bourcier T, Ancelle T, Batellier L, Dupouy-Camet J, et al. Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006; 26:221-224.
- Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, Silva AJ. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. J Clin Microbiol 2006; 44:1087-1089.
- Jojima FS, Garcia JL, Vidotto MC, Balarin MRS, Fabretti AK, Gasparini MR, et al. Occurrence and molecular characterization of *Babesia* species in a canine hospital population in the Londrina Region, Parana State, Brazil J Vet Parasitol 2008; 17:277-283.
- Muieed MA, Chaudhary ZI, Shakoobi AR. Comparative studies on the sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) and microscopic examination for the detection of *Trypanosoma evansi* in horses. Turk J Vet Anim Sci 2010; 24:507-512.
- Azizi K, Soltani A, Alipour H. Molecular detection of Leishmania isolated from cutaneous leishmaniasis patients in Jask County, Hormozgan Province, Southern Iran, 2008. Asian Pac J Trop Med 2012; 5:514-517.
- Shikanai-Yasuda MA, Ochs DE, Tolezano JE, Kirchhoff LV. Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90:649-651.
- Dorn PL, Engelke D, Rodas A, Rosales R, Melgar S, Brahney B, et al. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas vectors. Am J Trop Med Hyg 1999; 60:740-745.
- Edoh D, Steiger S, Genton B, Beck HP. PCR amplification of DNA from malaria parasites on fixed and stained thick and thin blood films. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997; 91:361-363.
- Brustoloni YM, Lima RB, Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, Oliveira ALL, et al. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102:497-500.
- Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol 1996; 34:1171-1175.
- Paula MBC, Costa IN, Freitas PA, Limongi JE, Pajuaba Neto AA, Pinto RMC, et al. Occurrence of positivity for *Trypanosoma cruzi* in triatomine from municipalities in Southeastern Brazil, from 2002 to 2004. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43:9-14.
- Toledo MJO, Kühl JB, Silva SV, Gasperi MV, Araújo SM. Estudo sobre triatomíneos e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* no estado do Paraná, sul do Brasil. resultados preliminares. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30:197-203.

5.2 Artigo II



Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 47(6):747-755, Nov-Dec, 2014
http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0234-2014

Major Article

Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil

Marlon Cezar Cominetti^[1], Bárbara Guimarães Csordas^[1],
Rodrigo Casquero Cunha^[2] and Renato Andreotti^[3]

[1]. Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. [2]. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. [3]. Laboratório de Biologia Molecular, Sanidade Animal, EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande, MS.

ABSTRACT

Introduction: This work presents the initial findings of a molecular epidemiological investigation of *Trypanosoma cruzi* in triatomine insects in State of Mato Grosso do Sul. **Methods:** A total of 511 triatomines from different regions of the state were examined. Deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted from the intestinal contents of the insects using phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1). Polymerase chain reaction (PCR) using primers 121/122 targeting DNA kinetoplast (kDNA) was then performed to identify *T. cruzi*, and positive samples were subjected to PCR using the primer pair TcSC5D-F/R followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) with the restriction enzymes SphI and HpaI (1 U/reaction), cloning and sequencing. **Results:** One hundred samples were positive for *T. cruzi*, and three discrete typing units (DTUs) were identified (TcI, TcII, and TcBat). *Triatoma sordida* had the highest *T. cruzi* occurrence (83.3%), and DTUs were found in three samples: 58.3% of the samples were TcI, 33.3% were TcII and 8.3% were TcBat. There was a clear geographical distribution of the DTUs throughout the state, with TcI, TcII and TcBat located in the center, TcI located in the east, and TcII located in the west. **Conclusions:** This study showed the occurrence of overlapping DTUs in State of Mato Grosso do Sul. The distributions of the DTUs were different, with TcI, TcII and TcBat in the center of the state, TcI predominantly in the east, and TcII in the west. Further studies may reveal a more defined mosaic distribution of DTUs in MS.

Keywords: *Trypanosoma cruzi* DTUs. PCR. Restriction fragment length polymorphism. Microscopy examination.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi, a protozoan flagellate belonging to the order Kinetoplastida and family Trypanosomatidae, is the etiologic agent of Chagas disease, which is one of the most important parasitic infections in Latin America, surpassed only by malaria. Over 10 million people are infected with this parasite. The disease is a complex zoonosis, with mammals serving as reservoirs and hosts¹, and is endemic to South and Central America² as well as some states in the United States of America³.

Transmission is primarily vectorial and occurs through parasite penetration of the host through injured skin or mucosa. The invertebrate vectors of *T. cruzi* are the triatomine insects Hemiptera, subfamily Reduviidae. Among the 138 described

species of triatomines, only four play a direct role in the epidemiology of the parasite: *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa e Espínola, 1964) and *Triatoma sordida* (Stal, 1859). In a study of triatomines in the State of Mato Grosso do Sul (MS), *T. sordida* was the most frequently observed species parasitized by flagellate protozoa⁴. The presence of three major of triatomine species was confirmed in MS: *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911), *P. megistus* (Burmeister, 1835) and *T. sordida* (Stal, 1859), with significant infestation rates in domestic and peridomestic areas only for *T. sordida* (9.3% and 86.6%, respectively). *T. brasiliensis* and *P. megistus* exhibited less than 0.2% infestation⁴.

Infection by *T. cruzi* is maintained in cycles of wild transmission over a broad range of mammalian reservoir hosts⁵. Human infection occurs due to the natural distribution of *T. cruzi* in triatomines that are adapted to the domestic environment or are peridomestic. However, infection also occurs orally through the ingestion of triatomines or food contaminated with the parasite, which is the most common form of transmission among wild animals, as well as through blood transfusion, organ transplantation and congenital infection⁶.

The population structure of the parasite is predominantly clonal, suggesting that recombination events are rare

Address to: Dr. Renato Andreotti. Lab. Biologia Molecular/Sanidade Animal/ EMBRAPA Gado de Corte. Av. Rádio Maia, Vila Popular, 79106-550 Campo Grande, MS, Brasil.

Phone: 55 67 3368-2173

e-mail: renato.andreotti@embrapa.br

Received 29 September 2014

Accepted 24 November 2014

in nature⁷, although there are complex sexual processes in *T. cruzi*⁸. Nonetheless, the parasite presents considerable genetic diversity⁹⁻¹¹.

Although intraspecific polymorphisms occur, an analysis of the isoenzyme patterns of *T. cruzi* isolates revealed three groups that are classified as zymodemes: Z1, Z2 and Z3^{12,13}. Subsequent studies using markers based on ribosomal gene and mini-exon (spliced leader) sequences revealed two major lineages, *T. cruzi* I (TcI) and *T. cruzi* II (TcII), and indicated the existence of hybrid lines (TcI/II)^{7,9,13-16}. DNA sequencing analysis revealed that the TcI group is a relatively homogeneous clade, whereas TcII is divided into five subgroups (a-e), with two or three distinct phylogenetic clades (IIa-c) and two hybrid strains (IId and IIe) that are derived from the clades of the IIb and IIc subtypes^{13,17-20}. A new classification of the types and subtypes divides *T. cruzi* into six strains called discrete typing units (DTUs), i.e., TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, and TcVI²¹, wherein TcI corresponds to the group TcI, TcII to subgroup TcIIb, TcIII to TcIIc, TcIV to TcIIa, TcV to TcIIId, and TcVI to TcIIe. More recently, a new DTU has been described, TcBat²².

The objective of this study was to investigate the distribution of *T. cruzi* DTUs from samples of triatomines collected from entomology cores of the State Secretariat of Health of MS using molecular methods.

METHODS

Study area

The State of Mato Grosso do Sul is located in the Midwest region of Brazil and has an area of 357,145,532km² with 79 municipalities, an estimated population of 2,619,657 inhabitants, and a population density²³ of 6.86 inhabitants/km². Approximately two-thirds of the state is a part of the Cerrado, a heterogeneous, floristic savannah that covers more than 2 million km² and extends from Central Brazil to parts of Bolivia and Paraguay²⁴. In the western area of the state lies the Pantanal, one of the richest floodplains in the world, with an abundance and diversity of wildlife, in addition to habitats with a complex mosaic of resources²⁵.

All insects were collected from the municipalities of Jaraguari (May to August 2009 and September 2011), *Rochedo*, *Caarapó*, *Douradina*, *Antônio João*, *Dourados*, *Terenos*, *São Gabriel do Oeste*, *Aparecida do Taboado*, *Paranaíba*, *Rio Verde de Mato Grosso*, *Corumbá*, *Miranda* and *Aquidauana* (August 2011 to November 2012) in the State of Mato Grosso do Sul using the method described by Cominetti et al.²⁶. The selection of municipalities was based on the collection of material by the regional units of the *Coordenadoria de Controle de Vetores do Estado de Mato Grosso do Sul* (CCV-MS).

Survey of triatomine fauna

Insects were collected by teams from regional units of the *Coordenadoria de Controle de Vetores do Estado de Mato Grosso do Sul* (CCV-MS). When found, the insects were collected and identified using the methodology described by Cominetti et al.²⁶

The state is currently divided into five Vector Technician cores, as established by the *Coordenadoria de Controle de Vetores* (CCV) of the *Secretaria Estadual de Saúde* (SES). These cores were responsible for the collection and identification of insects as well as for parasitological examinations, i.e., both fresh and thin-layer smear preparations.

After the tests, the collected triatomines were placed in tubes containing 70% alcohol and sent to the Animal Health unit of Embrapa Beef Cattle for molecular tests, as described by Cominetti et al.²⁷

Identification of triatomines and microscopic examination

Triatomines were identified using the dichotomous keys proposed by Carcavallo et al.²⁸ Flagellated protozoa were detected using the method described by Souza²⁹.

DNA extraction and PCR

DNA was extracted from insects as described by Westenberger et al.³⁰. The integrity of the DNA samples was determined via electrophoresis on a 0.8% agarose gel that was subsequently stained with ethidium bromide (0.5µg.mL⁻¹) and examined under ultraviolet light.

The DNA was quantified using a spectrophotometer (GeneQuantTM pro; Biochrom). An A260nm/A280nm ratio above 1.8 was established as ideal, and the concentration of each sample was adjusted to 20ng.µL⁻¹.

The following primers, described by Wincker et al.³¹, were used for the molecular identification of *T. cruzi*: 121 (5'-AAATAATGTACGGG(T/L)GAGATGCATGA-3') and 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'). This primer pair permitted the amplification of a 330-bp fragment of the *T. cruzi* kinetoplast (kDNA). The amplification scheme that was used was previously described by Schijman et al.³².

Under natural conditions, triatomines are often co-infected with *T. cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Therefore, the samples were also subjected to PCR for *T. rangeli* using the primers TRF3 (5'-CCCCATACAAAACACCCTT-3') and TrR8 (5'-TGGAATGACGGTGCGGCGAC-3'), which target the conserved subtelomeric region of this species (SubTr, GenBank accession number AF426020). The amplification protocol was previously described by Chiurillo et al.³³

Trypanosoma cruzi-positive samples were submitted to a second PCR targeting the TcSC5D gene (genome CL-Brener loci: TcCLB.473111.10, TcCLB.507853.10). To this end, the primers TcSC5D-fwd (5'-GGACGTGGCGTTTGATTAT-3') and TcSC5D-rev (5'-TCCCATCTTCTTCGTTGACT-3') were used, which amplify an 832-bp fragment. The amplification protocol that was used was previously described by Cosentino and Agüero³⁴.

The PCRs were performed in an Eppendorf AG 22331 thermocycler, and the DNA controls (*T. cruzi* as a positive control and *T. rangeli* as a negative control, as well as controls for the DTUs – TcI-VI and TcBat) were from a laboratory of the University of São Paulo (USP) and were provided by Dra. Marta M.G. Teixeira. Ultrapure water was used instead of template as an additional negative control.

The reactions were performed in a final volume of 25 µL containing 1X PCR buffer (Tris-HCl 10mM, pH 8.3; 50mM KCl), 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.2pmol each primer, 1U of Taq DNA polymerase (Platinum®, Invitrogen) and 20ng of genomic DNA.

After electrophoresis in an agarose gel (2%) and staining with ethidium bromide, the amplification products were visualized under UV light.

Identification of DTUs using restriction enzymes

All restriction enzymes were purchased from Promega (Southampton, UK). A 20-µL aliquot of the amplification product of the TcSC5D gene was digested in a single reaction with 1U of HpaI (R6305) and 1U of SphI (R6265) and heated to 37°C for 1h. The resulting restriction fragments were visualized under ultraviolet (UV) light after electrophoresis on an agarose gel (2%) and staining with ethidium bromide.

The process for identifying the DTUs followed the protocol described by Cosentino and Agüero³⁴ and is shown in a simplified form in **Figure 1**.

Sequencing

The amplified gene product was purified using a TcSC5D Purelink™ Kit (Invitrogen), followed by cloning into the pGEM-Teasy plasmid (Promega) according to the recommendations of the manufacturer. Sequencing was then performed using the method described by Sanger³⁵ and an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). The sequencing reactions were performed using the universal T7 primer for sequencing (5'-AATACGACTCACTATAG-3') and the BigDye® Terminator

v3.1 Cycle Sequencing Kit. The races were performed in 36-cm capillary tubes using POP7 polymer. The obtained sequences were analyzed, and the plasmid sequences were identified and removed using BioEdit software³⁶. The obtained sequences were compared with the sequences in the GenBank database, and a BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was performed to determine the sequence identity³⁷. Phylogenetic analyses were performed using the Geneious v.4.8.5 (Biomatters) software package³⁸.

RESULTS

DNA samples from 511 triatomines from 14 different regions of State of Mato Grosso do Sul were examined. Of these, 100 (19.6%) from eight municipalities were confirmed positive using PCR with primers 121/122, which target the kinetoplast deoxyribonucleic acid (kDNA) of the parasite. Of the 100 positive samples, 12 (12%) were amplified with primers TcSC5D-fwd/TcSC5D-rev, which target the TcSC5D gene. It was not possible to amplify the samples from the municipalities of Corumbá and Dourados using the TcSC5D-fwd/TcSC5D-rev primers (**Table 1**).

Trypanosoma cruzi-positive triatomines were uncovered in samples from six municipalities. It was possible to identify *T. cruzi* DTUs in 12 of the samples. Three DTUs were found in *T. sordida*, which was the most commonly infected species (83.3%), followed by *T. matogrossensis* and *P. megistus* (both with 8.3% infection); 58.3% of the 12 samples were TcI, 33.3% were TcII, and 8.3% were TcBat. There was a clear geographical distribution of DTUs in the state, with

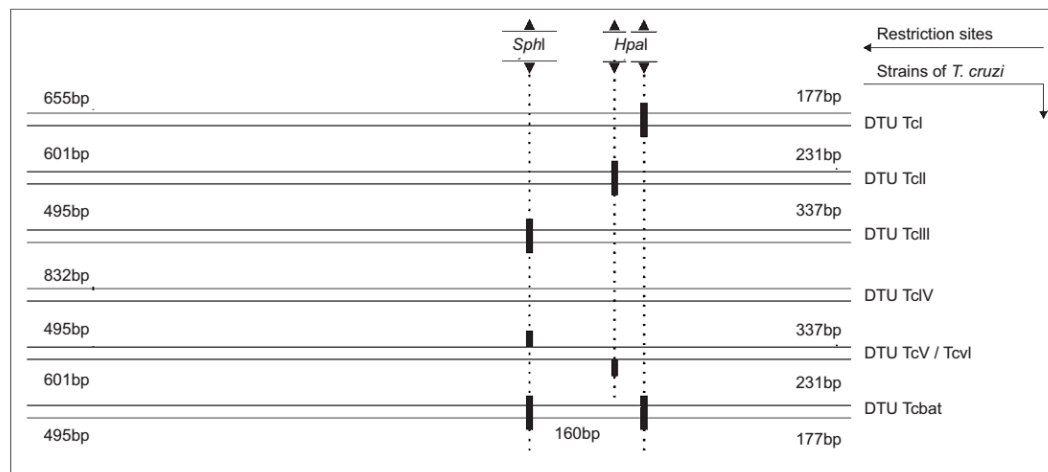


FIGURE 1 - Marker lineage using the TcSC5D gene. Simplified schematic representation of the TcSC5D amplicon and the polymorphic restriction sites HpaI/SphI, showing the presence/absence of *T. cruzi* in each strain (modified from Cosentino and Agüero³⁴). DTU: discrete typing units; T.: *Trypanosoma*.

TABLE 1 - Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* using primers 121/122 and the DTUs identified using primers TcSC5D-fwd/TcSC5D-rev in triatomines found in municipalities of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil.

Municipality	Triatomine	Number*	Positive		DTU
			121/122	TcSC5D-fwd/rev	
Jaraguari	<i>Triatoma sordida</i>	260	76	5	TcI
Terenos	<i>Triatoma sordida</i>	48	1	1	TcII
	<i>Triatoma matogrossensis</i>	9	5	1	TcII
Aquidauana	<i>Triatoma sordida</i>	12	2	1	TcII
	<i>Rhodnius</i> sp.	1	-	-	-
Aparecida do Taboado	<i>Triatoma sordida</i>	54	10	2	TcI
Rochedo	<i>Triatoma sordida</i>	64	3	1	TcBat
Caarapó	<i>Panstrongylus megistus</i>	1	1	1	TcII
Dourados	<i>Panstrongylus megistus</i>	1	1	-	-
Corumbá	<i>Triatoma sordida</i>	5	1	-	-
Miranda	<i>Triatoma sordida</i>	7	-	-	-
Rio Verde de Mato Grosso	<i>Triatoma sordida</i>	17	-	-	-
São Gabriel do Oeste	<i>Triatoma matogrossensis</i>	8	-	-	-
Paranaíba	<i>Triatoma sordida</i>	22	-	-	-
Antônio João	<i>Triatoma sordida</i>	1	-	-	-
Douradina	<i>Triatoma sordida</i>	1	-	-	-
Total		511	100	12	

*number of triatomines captured. DTU: discrete typing units.

TcI, TcII and TcBat located in the center, TcI in the east, and TcII in the west (**Figure 2**).

The PCR product generated from the TcSC5D gene was cloned and sequenced. After alignment and analysis of the nucleotide sequence, TcI, TcII and TcBat were found in 98-100% of the samples (**Figure 3**). It was not possible to sequence some of the samples; however, identification via RFLP revealed that DTUs were present in triatomines in those samples.

The reactions using primers for *T. rangeli* (data not shown) did not produce overlapping data, confirming that the amplicons were specific for *T. cruzi*.

DISCUSSION

The most commonly captured triatomine was *T. sordida*, which was similar to what was observed in previous studies, showing that this species, which is usually considered secondary, is the most frequently encountered species in MS^{4,26,27}. *Triatoma sordida* is native to the Cerrado, the biome in which State of Mato Grosso do Sul as well as the transition areas of Maranhão, Piauí, Bahia, the Pantanal and the eastern Chaco are located³⁹. This was also the species that harbored the greatest variety of DTUs (TcI, TcII and TcBat). As this species was the most frequently encountered, the likelihood of finding the largest

number of infected insect species as well as a greater variety of DTUs was higher.

Insect vectors usually occupy wild environments. However, if their habitat is degraded, they can relocate near human habitations, such as corrals, sties or chicken coops as well as other peridomestic constructions. Although all captured triatomines were found in peridomestic, their mere coexistence with an insect vector increases the chances of infection⁴⁰. One notable factor is that TcII was associated with the severe forms of Chagas disease that were found south of the Amazon region^{41,42}; however, other factors are also associated with a higher or lower pathogenicity of the parasite⁴³, and its presence near residences is therefore reason to focus attention on the control of triatomines, even though this DTU was found less frequently in this study.

Trypanosoma cruzi is extremely successful, as observed by its continental distribution and its broad host range, which was replicated in our State of Mato Grosso do Sul data. The DTUs found in this work are common in MS, and other studies have identified their presence in the Pantanal region^{22,44}. **Figure 2** shows that the central region of State of Mato Grosso do Sul had the largest variety of DTUs, presenting TcI, TcII and TcBat (first report of natural infection in triatomines).

Although TcI was also found in the western area of the state^{22,44}, this DTU was found to infect triatomines in only

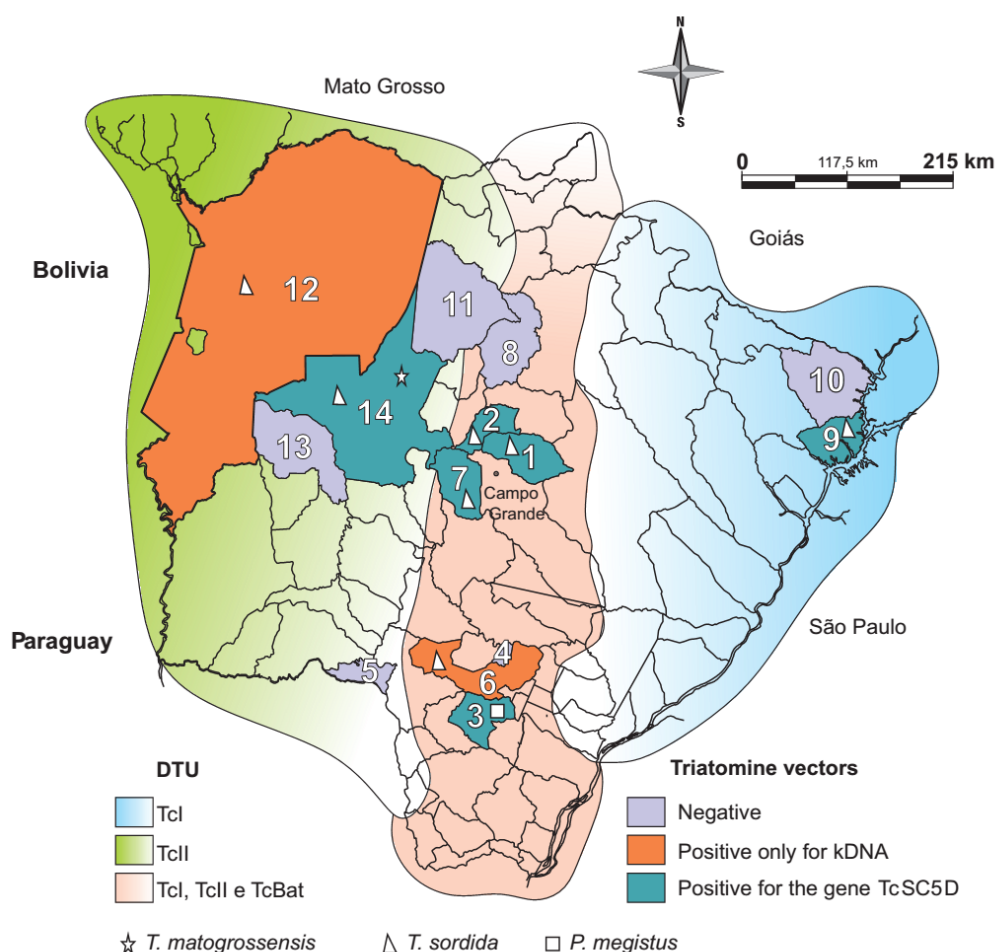


FIGURE 2 - Map of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil, highlighting the cities where the triatomines were captured and the distribution of the DTUs found in infected insects. 1: Jaraguari; 2: Rochedo; 3: Caarapó; 4: Douradina; 5: Antônio João; 6: Dourados; 7: Terenos; 8: São Gabriel do Oeste; 9: Aparecida do Taboado; 10: Paranaíba; 11: Rio Verde de Mato Grosso; 12: Corumbá; 13: Miranda; 14: Aquidauana. DTU: discrete typing units; kDNA: kinetoplast deoxyribonucleic acid. *T.*: *Triatoma*; *P.*: *Panstrongylus*.

the central and eastern areas of the state. Other studies have demonstrated the presence of TcI in São Paulo (SP)⁴⁵ and Minas Gerais (MG)⁴⁶, neighboring states to the East of MS, and in the City of Aparecida do Taboado. However, the occurrence of more than one DTU was observed in SP and MG. One of the factors that may be associated with finding only one TcI in the eastern area of MS may be that it is the most anthropized portion of the state⁴⁷, with large agropastoral formations that reduce the availability of meat for triatomines. As *T. sordida* was the most abundant species, is predominantly ornithophilous and was obtained from henhouse peridomestic, finding other DTUs in the studied sites might be difficult. The incidence of TcII was higher in the west,

which is similar to the results of previous work with vectors and other wild animals, but this DTU was found mainly in the Pantanal region^{44,48}. One possible explanation for this localization is that the region is preserved (in relation to the eastern state), leading to an increased supply of hosts as food sources for the insect vectors, thus facilitating the movement of the parasite. Studies indicate the occurrence of at least approximately 124 species of mammals in the Pantanal region alone⁴⁹⁻⁵², but this is only an estimate, and further studies may confirm or refute this hypothesis. However, as the dispersion and isolation of *T. cruzi* is limited by the dispersion of their hosts, which include several orders of mammals and triatomines⁵³, this idea deserves more attention.

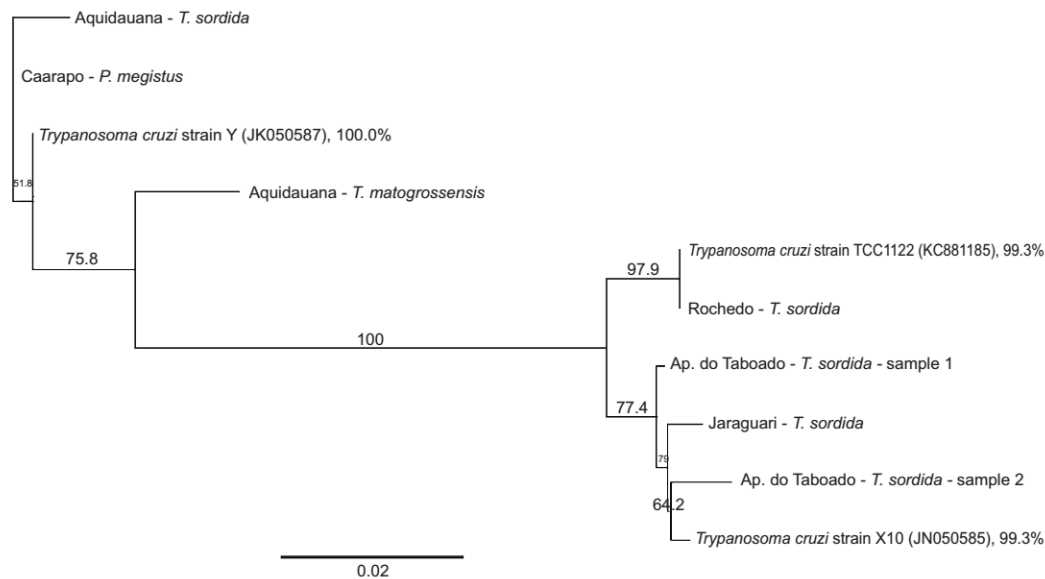


FIGURE 3 - Partial sequence of the TcSC5d gene. Phylogenetic position of the samples of different genotypes in relation to other DTUs of *Trypanosoma cruzi*. The analysis was performed with 1,000 bootstrap replicates. The number in parentheses next to the accession number is the GenBank. The scale bar indicates the nucleotide substitutions per site. DTU: discrete typing units. *T.*: *Triatoma*; *P.*: *Panstrongylus*.

Other studies have demonstrated that TcIII is present in central MS⁴⁵, which is the same area where TcI is prevalent, more specifically, in the community of Furnas do Dionísio, Jaraguari. This is a rural Quilombola community located 45km from Campo Grande, the capital of MS. The community comprises approximately 1,031ha, with modest brick houses that are often near wood sties, chicken coops and pens. However, although Marcili et al.⁴⁵ found TcIII circulating in dogs, the present study showed that only TcI circulated in triatomines and TcII circulated in bats (data not shown) in this community. TcI is a DTU that is widely distributed from South to North America, with most of the isolates from the Amazon region⁵⁴⁻⁵⁷. Although TcI is known to be predominantly wild and the source of more frequent, serious infections in humans in Central America, Venezuela⁵⁸ and even in the Amazon region, studies have shown that TcI can manifest severe forms of Chagas disease, especially when co-infection occurs in humans with different DTUs^{42,59}. In this case, the epidemiological situation of the studied community has drawn attention because it is located between hills, resulting in a high frequency of infected insects and a large number of natural and artificial ecotopes, as described by Cominetti et al.²⁶; it is therefore an ideal environment for triatomine colony infestations. Moreover, the observed TcII infection of bats leads to the question of whether there is overlap between peridomestic and sylvatic cycles that leads to an exchange of the *T. cruzi* types found in the area. Eco-epidemiological and molecular

studies are needed in this region and are now being performed to elucidate this question.

The same types found in the central areas of MS, except for TcBat, were also found in the State of Paraná⁶⁰, which is a route of passage for DTUs (Figure 2). However, it can be inferred from our data, in contrast to other studies^{44,45,48}, that it is not possible to delimit DTUs to a specific region. The overlap of DTUs can result from the variety of intricate types of dispersion of the parasite due to the peculiar mechanisms of vector reinfestation⁶¹ the wide variety of hosts, which are abundant and conspicuous in the Cerrado¹⁹, and from environmental heterogeneity⁶².

Despite the fact that we did not demonstrate mixed infection by TcI and TcII in insect vectors, as reported by Abolis et al.⁶⁰, this phenomenon may also occur in MS because the conditions for these mixed infections in triatomines are present in this state. Three DTUs were identified in the center of the state and in nearby municipalities. In addition, the Cerrado biome, which covers a large portion of MS, has significant horizontal variation, with open fields, capons, woods, forests and wetlands that potentially coexist in the same region¹⁹. These data add more strength to the idea that the distribution of the parasite is very wide and dynamic.

TcBat, a trypanosome that, until now, had been found only in bats and a child⁶³, has been identified in *T. sordida*. This

finding extends the distribution of this DTU in the state, as it was previously described only in the Pantanal region of MS^{22,48}. Additionally, this is the first report of this DTU in a naturally infected triatomine, which had not been previously described, even after attempts at laboratory infection²². However, it is expected that the incidence of this DTU is more frequent because it is most closely related to TcI, the most widely distributed DTU in MS, and has finally been identified to infect a triatomine. In the same region, TcII was found in a sample of DNA extracted from the blood of an armadillo (*Euphractus sexcinctus*) (data not shown).

This study demonstrates the occurrence of overlapping DTUs in the State of Mato Grosso do Sul. The geographical distributions of the DTUs follow different patterns, with TcI, TcII and TcBat in the center, TcI predominantly in the east, and TcII in the west. Furthermore, TcI was the most frequent DTU in triatomines, followed by TcII and TcBat. This study provides greater insight into the distribution of *T. cruzi* in Brazil, but further studies may reveal a more defined mosaic distribution of DTUs in MS over the long term.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the *Laboratório Regional de Entomologia, Núcleo Regional Saúde*, and *Secretaria de Estado de Saúde* for assistance and Dr. Marta M.G. Teixeira (*Universidade de São Paulo*, Brazil) for the generous gift of *T. cruzi* and *T. rangeli* genomic DNA.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

Support for this work was provided by *Embrapa Gado de Corte, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)* and *Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect-MS)*. A PhD scholarship was provided by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*.

REFERENCES

- Miles MA, Feliciangeli MD, Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* 2003; 7404:1444-1448.
- Guhl F, Schofield CJ. Population genetics and control of Triatominae. *Parasitol Today* 1996; 5:169-170.
- Roellig DM, Brown EL, Barnabé C, Tibayrenc M, Steurer FJ, Yabsley MJ. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg Infect Dis* 2008; 7:1123-1125.
- Almeida PS, Ceretti Júnior W, Obara MT, Santos HR, Barata JM. Survey of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) fauna in domestic environments and natural infection by Trypanosomatidae in the State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 4:374-380.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sanchez H, Adamson S, Miles GA, et al. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol* 2004; 35:225-233.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375:1388-1402.
- Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala F. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 4:1335-1339.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame JA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 2003; 6926:936-939.
- Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 3:217-225.
- Miles MA, Cedillos RA, Pova MM, Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet* 1981; 1:1338-1340.
- Miles MA, Arias JR, Souza AA. Chagas' disease in the Amazon basin: V. Periurban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes*-triatomine vectors of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1983; 78:391-398.
- Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* strains in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 1978; 5656:819-821.
- Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in Vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 1:1-12.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 6:807-811.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 2:141-152.
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, et al. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol* 1998; 1:105-112.
- Brise S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and miniexon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 2001; 11:1218-1226.
- Coura JR. Trypanosomiasis, chagas disease. *Ciênc Cult* 2003; 1: 30-33.
- Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 13:7396-7401.
- Silva AV, Bosco SMG, Langoni H, Bagagli E. Study of Toxoplasma infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. *Vet Parasitol* 2006; 1:81-83.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. New consensus for *Trypanosoma cruzi*

- intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TCI to TCVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 7:1051-1054.
22. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology 2009; 6:641-655.
 23. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [Internet]. Brasília: IBGE. Available at: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ms>.
 24. Simon MF, Grether R, Queiroz LP, Skema C, Pennington RT, Hughes CE. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 48:20359-20364.
 25. Harris MB, Tomas WM, Mourão G, Silva CJ, Guimarães E, Sonoda F. Desafios para proteger o Pantanal brasileiro: ameaças e iniciativas em conservação. Megadiversidade 2005; 1:156-164.
 26. Cominetti MC, Andreotti R, Oshiro ET, Dorval MEMC. Epidemiological factors related to the transmission risk of *Trypanosoma cruzi* in a Quilombola community, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2011; 5:575-581.
 27. Cominetti MC, Almeida RF, Gonçalves GM, Andreotti R. Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2013; 3:277-280.
 28. Carcavallo RU, Rodrigues MEF, Galvão C, Rocha DS, Girón IG, Arocha MAO, et al. Habitats e fauna relacionada. In: Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, editors. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1997. p. 107-244.
 29. Souza MA. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94:205-210.
 30. Westenberger SJ, Sturm NR, Yanega D, Podlipaev SA, Zeledón R, Campbell DA, et al. Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. Parasitology 2004; 129:537-547.
 31. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples patients in a rural endemic area. Am J Trop Med Hyg 1994; 51:771-777.
 32. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Jaramillo AMM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5:e931.
 33. Chiurillo MA, Crisante G, Rojas A, Peralta A, Dias M, Guevara P, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10:775-779.
 34. Cosentino RO, Agüero F. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. PLoS Negl Trop Dis 2012; 7:e1777.
 35. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 1977; 74:5463-5467.
 36. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 1999; 41:95-98.
 37. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990; 215:403-410.
 38. Drummond AJ, Ashton BMC, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, et al. Geneious v 4.8. [Software]. 2009. Available at: <http://www.geneious.com/>
 39. Forattini OP. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliary in Brazil. Rev Saude Publica 1980; 6:964-968.
 40. Toledo MJO, Kühl JB, Silva SV, Gasperi V, Araújo SM. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliary in Brazil. Rev Saude Publica 1997; 3:197-203.
 41. Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. Int J Parasitol 2007; 37:1319-1327.
 42. del Puerto R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C, et al. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4:e687.
 43. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99:1-12.
 44. Herrera HM, Lisboa CV, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, et al. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008; 11:1133-1339.
 45. Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. Infect Genet Evol 2009; 6:1265-1274.
 46. Viana EN. Dinâmica de reinfestações por triatomíneos e alterações ambientais na ecoepidemiologia da doença de Chagas em área de *Triatoma sordida* Stål 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) no norte de Minas Gerais, Brasil [PhD thesis]. [Belo Horizonte]: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas; 2001. 280 p.
 47. Machado RB, Ramos Neto MB, Pereira P, Caldas E, Gonçalves D, Santos N, et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Brasília: Conservation International do Brasil; 2004.
 48. Cavazzana Jr M, Marcili A, Lima L, Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, et al. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus Schizotrypanum parasitic in Brazilian bats. Int J Parasitol 2010; 3:345-55.
 49. Alho CJR, Lacher TE. Mammalian conservation in the Pantanal of Brazil. In: Mares MA, Schmidly DJ, editors. Latin American mammalogy: history, biodiversity and conservation. University of Oklahoma Press; 1991. p. 280-294.
 50. Mourão G, Coutinho M, Mauro R, Campos Z, Tomás W, Magnusson W. Aerial surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the Pantanal wetland of Brazil. Biol Cons 2000; 92:175-183.
 51. Tomas WM, Lima Borges PA, Rocha HJF, Sá Filho R, Kutchenski Jr F, Udry TV. The potential of the Aquidauana and Miranda rivers, in the Pantanal Wetland, for the conservation of the giant river otter (*Pteronura brasiliensis*). In: Dantas M, Resende EK, Comastri Filho JA, editors. Anais do III Simpósio sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal. Corumbá: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa-Pantanal; 2002. p. 1-12.
 52. Sanderson EW, Chetkiewicz CLB, Medellín RA, Rabinowitz A, Redford KH, Robinson JG, et al. Un análisis geográfico del estado de conservación y distribución de los jaguars através de su área de distribución. In: Medellín RA, Equihua C, Chetkiewicz CLB, Crawshaw Jr PG, Rabinowitz A, Redford KH, et al, editors. El jaguar en el Nuevo milenio. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México, Nova York: Wildlife Conservation Society; 2002. p. 551-560.
 53. Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: one parasite, two parasites or several parasites of chagas disease? Rev Biol 2011; 6b:44-48.

5.3 Artigo III

Título completo: Entomofauna Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) em Mato Grosso do Sul, Brasil, e influência de elementos climáticos sobre suas populações.

Título corrido: Entomofauna Triatominae

Título em inglês: Triatominae fauna (Hemiptera: Reduviidae) in Mato Grosso do Sul, Brazil, and the influence of climatic elements on their populations.

Autores

- Marlon Cezar Cominetti - Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.
- Renato Andreotti - Sanidade Animal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

Endereço para correspondência

Marlon Cezar Cominetti

e-mail: mcominetti@gmail.com

+55 (67) 3326-1429

Rua: Desembargador Leão Neto do Carmo, S/N, Parque dos Poderes, 79031-902 Campo Grande - MS, Campo Grande, MS, Brasil.

Resumo

Introdução: O objetivo deste estudo foi estudar a entomofauna Triatominae capturada no período de 2006 a 2009 em Mato Grosso do Sul e a influência de elementos climáticos sobre suas populações, fornecendo subsídios para orientar os trabalhos de controle vetorial no estado. **Métodos:** Verificou-se o índice de infecção natural, as classes de abundância, constância, frequência e dominância, bem como a influência de fatores climáticos sobre a frequência de triatomíneos. **Resultados:** Dos 14.178 espécimes coletados, 2.118 (14,94%) estavam no intradomicílio e 12.060 (85,06%) no peridomicílio. O índice de infecção natural em *Triatoma matogrossensis* foi de 18,18%,

seguido por *Rhodnius neglectus* (0,46%) e *Triatoma sordida* (0,27%). *Triatoma sordida* foi a espécie mais frequente, constante, abundante e dominante. Foi observada a influência de fatores climáticos no encontro dos triatomíneos no período de janeiro a dezembro e ao longo dos oito anos pesquisados. Fatores climáticos como umidade relativa do ar e temperatura afetaram a frequência dos insetos. **Conclusão:** Apesar de Mato Grosso do Sul ser considerado livre da transmissão vetorial endêmica por *Triatoma infestans*, o persistente encontro de vetores naturalmente infectados por *Trypanosoma cruzi* ainda é digno de atenção, e as informações deste trabalho poderão melhorar as ações de combate ao vetor no estado.

Descritores: Triatomíneos, *Trypanosoma cruzi*, elementos climáticos.

Introdução

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, antroponose complexa, com mamíferos servindo como reservatórios e hospedeiros [1], é classificado em sete linhagens – TcI a TcVII [2,3] - chamadas Discretas Unidades de Tipagem (DTU), e se utiliza de triatomíneos, insetos hemípteros da família Reduviidae, para sua transmissão.

Apesar de um total de 142 espécies de triatomíneos, agrupadas em cinco tribos formadas por 18 gêneros [4-6], apenas três gêneros têm importância epidemiológica na cadeia de transmissão do parasito - *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius* [4] - e não mais que quatro espécies estão diretamente envolvidas: *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*.

A presença de três espécies principais de vetores foram confirmadas em Mato Grosso do Sul-MS: *T. brasiliensis*, *P. megistus* e *T. sordida*, sendo esta última a única com significativos índices de infestação domiciliar e peridomiciliar (9,3% e 86,6%, respectivamente). *T. sordida* é a espécie capturada com maior frequência [7-10] e apresenta o maior número de espécimes com infecção natural por *T. cruzi* [8,10]. *T. brasiliensis* e *P. megistus* apresentam baixos índices (<0,2%) de infestação [7]. No entanto, esses valores podem estar subestimados [9].

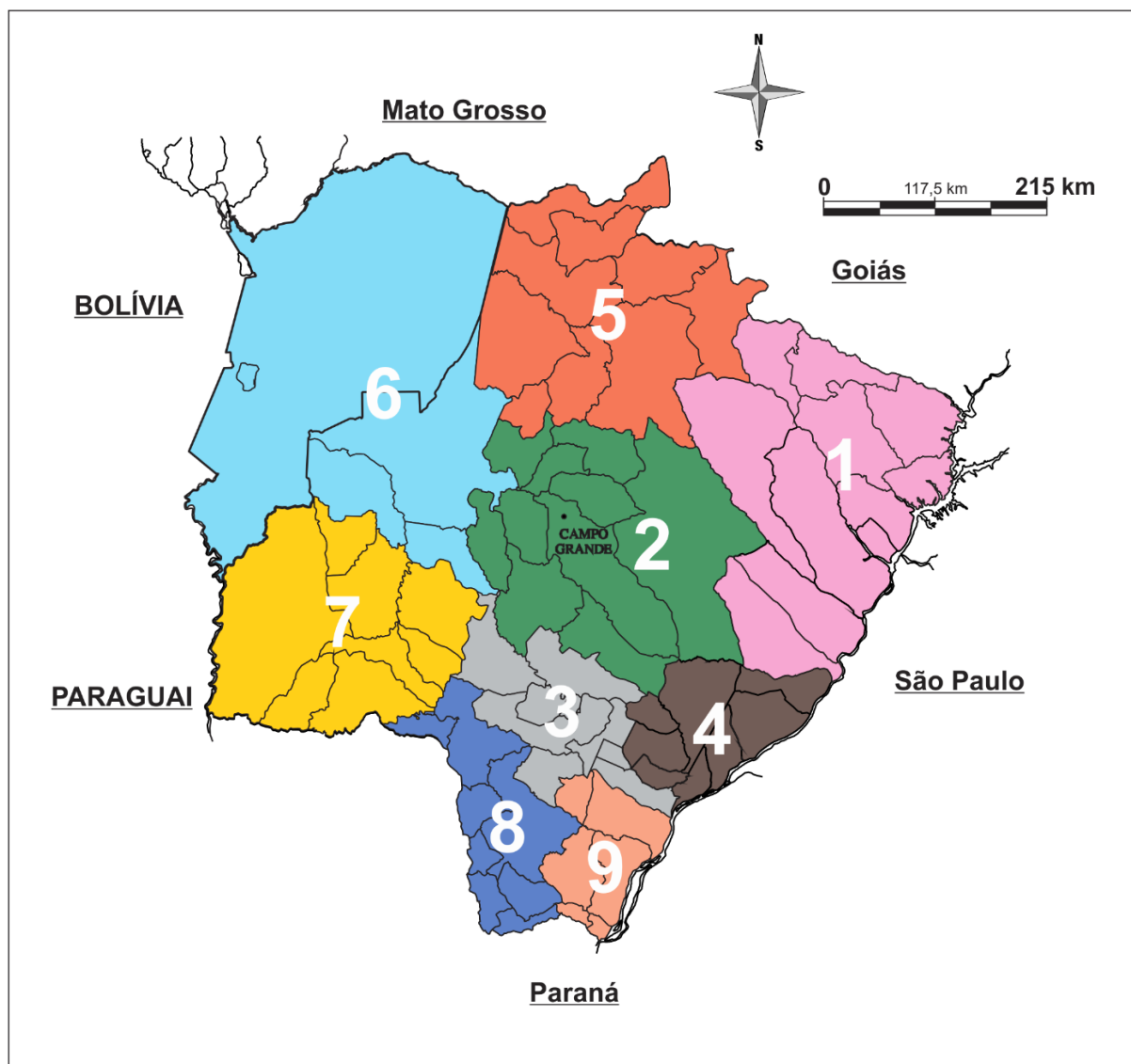
Cominetti *et al.*, [10] relatam a circulação de três DTU em triatomíneos no MS sendo que em *T. sordida* foram encontrados TcI, TcII e TcBat/TcVII e em *Triatoma matogrossensis* o TcII.

O objetivo deste trabalho foi estudar a entomofauna Triatominae capturada no estado durante o período de 2006 a 2009, e a influência de elementos climáticos sobre suas populações, fornecendo subsídios para orientar os trabalhos de controle vetorial em Mato Grosso do Sul.

Material e Métodos

O Estado de Mato Grosso do Sul (MS) possui 79 municípios distribuídos em uma área de 357.145.534 km² e população estimada de 2.619.657 habitantes [11]. Faz fronteira a leste com os estados de Minas Gerais e São Paulo, ao norte com os estados de Mato Grosso e Goiás, ao sul com o Estado do Paraná e com o Paraguai e ao oeste com a Bolívia (Fig 1). Está dividido em nove Regiões de Planejamento (RP) conforme o Estudo da Dimensão Territorial do Estado de Mato Grosso do Sul [12] que são: Bolsão, Campo Grande, Grande Dourados, Leste, Norte, Pantanal, Sudoeste, Sul-fronteira e Cone-Sul (Fig 1).

Fig 1. Regiões de Planejamento conforme o Estudo da Dimensão Territorial do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil



1: Bolsão; 2: Campo Grande; 3: Grande Dourados; 4: Leste; 5: Norte; 6: Pantanal; 7: Sudoeste; 8: Sul-fronteira; 9: Cone-Sul.

Fonte: COMINETTI (2015)

Para estudar a entomofauna de triatomíneos vetores de *T. cruzi* do Estado de MS, no período de 2006 a 2014 em 50 municípios do estado, analisaram-se as informações de bancos de dados do Controle da Doença de Chagas (PCDCh) desenvolvido pela Coordenadoria de Controle de Vetores (CCV). A identificação dos insetos foi realizada seguindo Carcavallo *et al.* [13]. Foram determinadas a distribuição mensal e anual das espécies de triatomíneos, índice de infecção natural [14] e análise faunística para definir as classes de abundância, constância, frequência e dominância [15].

As espécies predominantes são aquelas que se destacaram por obter os maiores índices faunísticos de abundância, frequência, constância e dominância [16].

Foram calculadas as médias de temperatura (T), umidade relativa do ar (UR) e precipitação (P) em milímetros (mm), com dados obtidos na base de dados da Estação da Embrapa Agropecuária Oeste [17], para meses (janeiro a dezembro) e para anos (2006 a 2014).

Para verificar a relação entre os triatomíneos coletados com as Regiões de Planejamento, ecótopo, positividade e frequência das espécies ao longo de meses e anos foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman. Para verificar a influência dos elementos climáticos sobre a frequência dos insetos vetores e sua distribuição ao longo das Regiões de Planejamento foi utilizada a análise de regressão linear múltipla. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS, versão 20.

Resultados

Foram coletados e identificados 14.178 espécimes de triatomíneos em 50 municípios de MS, divididos entre oito RP (Fig 1). Na região Cone-Sul não houve coleta de triatomíneos sendo descartada do trabalho. Foram identificadas as espécies *T. sordida*, *T. matogrossensis*, *T. baratai*, *Panstrongylus diasi*, *P. megistus*, *P. geniculatus* e *Rhodnius neglectus*.

T. sordida foi a espécie mais capturada (13.642 – 96,22%), seguida de *R. neglectus* (217 – 1,53%), *P. geniculatus* (158 – 1,11%) e *T. matogrossensis* (99 – 0,70%). As demais espécies perfizeram um total de 62 exemplares (0,44%) (Tabela 1).

Tabela 1- Triatomíneos capturados por Região de Planejamento de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2006 - 2014

Espécies	Regiões de Planejamento																Total	
	Bolsão		Campo Grande		Grande Dourados		Leste		Norte		Pantanal		Sudoeste		Sul-fronteira			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>T. sordida</i>	6268	45,95	2957	21,68	211	1,55	31	0,23	157	1,15	3730	27,34	239	1,75	49	0,35	13,642	96,22
<i>T. matogrossensis</i>	-	-	1	1,01	-	-	-	-	34	34,34	63	63,64	1	1,01	-	-	99	0,70
<i>T. baratai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	12,12	29	87,88	-	-	33	0,23
<i>P. diasi</i>	7	70	-	-	2	20	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0,07
<i>P. megistus</i>	9	47,37	-	-	8	42,11	-	-	-	-	1	5,26	1	5,26	-	-	19	0,13
<i>P. geniculatus</i>	1	0,63	4	2,53	149	94,30	-	-	-	-	4	2,53	-	-	-	-	158	1,11
<i>R. neglectus</i>	83	38,25	1	0,46	109	50,23	11	5,07	-	-	5	2,30	8	3,69	-	-	217	1,53
Total	6368	44,91	2963	20,90	479	3,38	43	0,30	191	1,35	3807	26,85	278	1,96	49	0,35		14178

Nota: Não houve coletas na região Cone-Sul.

Houve correlação entre o número de triatomíneos capturados por espécie e as Regiões de Planejamento ($p=0,025$). *T. sordida* foi a espécie que ocorreu com maior frequência em todas as regiões. As demais espécies apresentaram valores inferiores a 2% (Tabela 1).

Do total de amostras coletadas, 2.118 (14,94%) foram no intradomicílio e 12.060 (85,06%) no peridomicílio (Tabela 2). Ocorreu relação significativa entre a frequência de capturas dos triatomíneos e o tipo de ambiente ao longo dos meses ($p=0,002$).

Tabela 2- Triatomíneos capturados por ecótopo em Mato Grosso do Sul, Brasil, 2006 – 2014 (n=14.178)

Espécies	Ecótopo				Positivos
	Intradomicílio		Peridomicílio		
	n	%	n	%	
<i>T. sordida</i>	1.769	83,52	11.873	98,45	37 (66,07%)
<i>T. matogrossensis</i>	32	1,51	67	0,56	18 (32,14%)
<i>T. baratai</i>	18	0,85	15	0,12	-
<i>P. diasi</i>	9	0,42	1	0,01	-
<i>P. megistus</i>	8	0,38	11	0,09	-
<i>P. geniculatus</i>	114	5,38	44	0,36	-
<i>R. neglectus</i>	168	7,93	49	0,41	1 (1,78%)
Total	2.118	14,94	12.060	85,06	56

T. sordida foi caracterizado como muito abundante, enquanto as espécies restantes foram raras. Na avaliação da constância - o número de vezes que se recuperou uma determinada espécie no total de coletas efetuadas - observou-se que a espécie que esteve mais presente foi *T. sordida*, caracterizada como constante. Nenhuma espécie foi considerada como acessória. As espécies *T. matogrossensis*, *T. baratai*, *P. diasi*, *P. megistus*, *P. geniculatus* e *R. neglectus* foram caracterizadas como acidentais (Tabela 3).

Tabela 3- Espécies de triatomíneos capturados e suas respectivas classes de abundância, frequência, constância e dominância em Mato Grosso do Sul, Brasil, 2006 - 2014

Espécies	n	Índices			
		abundância ¹	frequência ²	constância ³	dominância
<i>T. sordida</i>	13642	ma	mf	w	Dominante
<i>T. matogrossensis</i>	99	r	pf	z	Não dominante
<i>T. baratai</i>	33	r	pf	z	Não dominante
<i>P. diasi</i>	10	r	pf	z	Não dominante
<i>P. megistus</i>	19	r	pf	z	Não dominante
<i>P. geniculatus</i>	158	r	pf	z	Não dominante
<i>R. neglectus</i>	217	r	pf	z	Não dominante
Total	14178				

1. ma: muito abundante; a: abundante; c: comum; d: dispersa; r: rara

2. mf: muito frequente; f: frequente; pf: pouco frequente

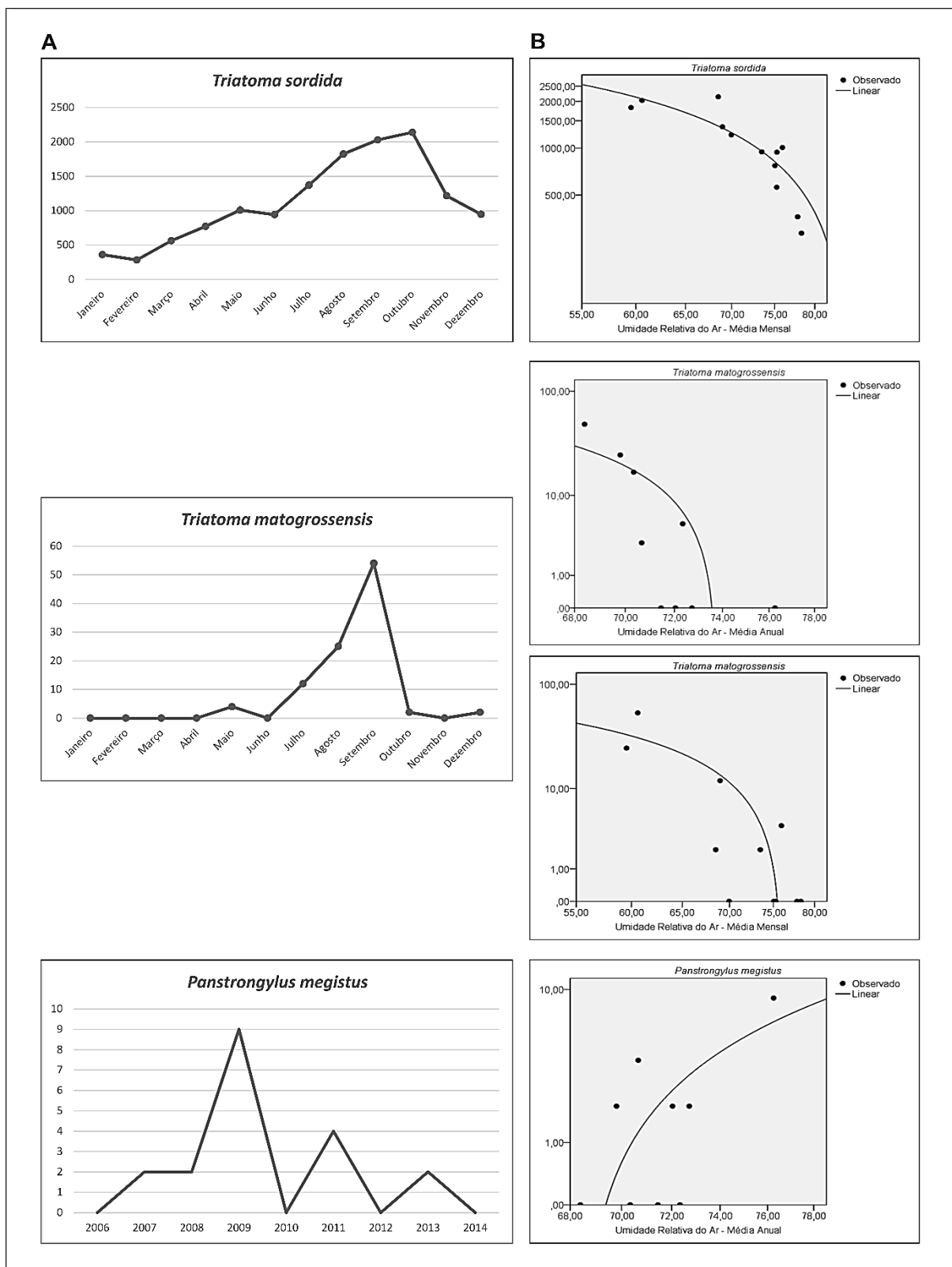
3. w: constante; y: acessória; z: acidental

T. sordida foi caracterizada como espécie muito frequente e dominante em MS (Tabela 3), enquanto as demais pouco frequentes.

Verificou-se correlação entre o número de triatomíneos capturados por espécie e a frequência de indivíduos positivos para *T. cruzi* ($p=0,008$). O maior índice obtido refere-se a *T. matogrossensis* (18,18%), seguido por *R. neglectus* (0,46%) e *T. sordida* (0,27%) (Tabela 2).

A análise temporal dos dados mostra correlação entre o número de triatomíneos capturados e o mês da captura ($p<0,01$) e a análise de regressão linear múltipla apresentou influência da T e UR sobre algumas espécies de triatomíneos (Fig 2).

Figura 2- Frequência de triatomíneos e influência da umidade relativa do ar em suas populações em Mato Grosso do Sul, Brasil, 2006 - 2014



A. Frequência de triatomíneos. B. Influência da umidade relativa do ar. Distribuição em logarítmo natural.

Nota: demais espécies não foram inseridas devido a; menor importância na cadeia epidemiológica, pequeno número de espécimes capturados e/ou ausência de correlação estatística.

Discussão

A espécie mais frequente neste estudo, assim como em outros desenvolvidos em MS [7,8,10], foi *T. sordida*. É uma espécie nativa do Cerrado, bioma predominante do estado e que se estende por uma área de 2.04 milhões de quilômetros quadrados englobando o Estado de Goiás, Distrito Federal e parte de Minas Gerais, Rondônia, Mato Grosso, Bahia, Tocantins, Maranhão, Piauí e Pará [18-21]. Triatomíneo com baixa frequência intradomiciliar (12,97%), concordando com outros trabalhos que já mostraram que *T. sordida* é predominantemente peridomiciliar em MS [7,8]. O simples encontro de triatomíneos infectados, mesmo que em baixa frequência, como o caso de *T. sordida* (0,24%), deve ser tratado como sinal de alerta uma vez que a transmissão vetorial tem possibilidade de ocorrer [22]. Entretanto, a preferência alimentar pode estar mais relacionada à oportunidade do que uma tendência a determinada fonte alimentar [23].

Em pesquisa recente, *T. sordida* foi encontrada com a maior variedade de DTU (TcI, TcII e TcBat/TcVII) [10]. Isso aponta para sua capacidade de albergar tipos diferentes de *T. cruzi* e, como a sua distribuição é ampla e quase constante a captura ao longo do ano (Fig 3), essa espécie de triatomíneo torna-se um importante sentinela da circulação do parasito, além de elevar seu potencial como vetor de *T. cruzi*.

T. sordida foi a espécie predominante. Ecologicamente, o termo dominante faz referência ao organismo que sofre impacto do ambiente mudando-o de forma, podendo causar o desaparecimento (ou aparecimento) de outros taxons [24]. Dessa maneira, a espécie predominante pode prevalecer sobre as outras na busca por recursos. De fato, posterior à eliminação das populações domiciliadas de *T. infestans*, *T. sordida* foi a espécie mais capturada no estado. Após o aumento de nichos vagos deixados por *T. infestans*, espécies secundárias assumiram posição de destaque em frequência de capturas [25-27]. Dentre essas, *T. sordida* apresentou grande capacidade de ocupação de ecótopos domésticos e peridomésticos.

Seu valor como vetor do *T. cruzi* tem sido tratado como de baixa relevância no estado. Explica-se isso devido a seus hábitos predominantemente ornitofílicos e sua reduzida taxa de infecção natural. Entretanto, Cominetti *et al.* [9] sugerem que essas taxas podem estar subestimadas. Se os mesmos dados apresentados na Tabela 2 para o nível de infecção natural forem tratados como os encontrados por Cominetti *et al.* [9], teríamos *T. sordida* com 1.118 (8,2%) positivos, ante 37 (0,27%), mostrando

que pode não ser tão irrelevante sua capacidade vetorial quando se leva em conta a frequência de indivíduos infectados. Além disso, deve-se considerar o fato de serem dados secundários e muitas amostras coletadas não terem sido analisadas por motivos diversos como, por exemplo, inseto morto e/ou sem conteúdo intestinal, bem como falhas involuntárias no registro dos dados. Assim, muitos desses valores podem estar aquém da realidade e serem mais expressivos que os apresentados neste trabalho quanto a suas taxas de infecção.

T. matogrossensis já foi encontrado invadindo ambiente domiciliar e apresenta tendência à domiciliação [28,29]. Em trabalho anterior [14] essa espécie não foi encontrada naturalmente infectada, porém, sua taxa de infecção (18,18%) no presente estudo chama a atenção e é motivo de preocupação. Apesar de ser uma espécie de ambiente rochoso e de ecótopo silvestre, 32,32% desses triatomíneos foram capturados em ambiente domiciliar, o que constitui motivo de preocupação, pois é uma espécie com boa capacidade vetorial para *T. cruzi* [30]. *R. neglectus* é predominantemente silvestre, ocorrendo em palmeiras [28,29] e com baixos índices de infecção por *T. cruzi* [31].

Apesar de *P. diasi*, *R. neglectus*, *P. geniculatus* e *T. baratai* não apresentarem grande importância epidemiológica, estudos mostram que *R. neglectus* pode formar colônias domiciliares [31,32] expondo destacada sinantropia no Centro-Oeste brasileiro [31], além de ser a mais frequente no intradomicílio [7,33], o que pode levar a um aumento de sua capacidade de transmissão. *P. geniculatus* também é descrito com baixo potencial de transmissão de *T. cruzi* devido a sua pequena capacidade de domiciliação [34] e por habitar tipicamente tocas de tatus [35-37]. De fato, apenas 1,11% dos espécimes coletados foi *P. geniculatus*. Porém, o encontro mais frequente desse inseto em ambiente doméstico poderia ser um indício de domiciliação, como relatado no peridomicílio na região amazônica [38,39] e no intradomicílio na Colômbia e Venezuela [40-42]. *T. baratai* é considerado silvestre, apesar de seu encontro em ambiente doméstico e peridoméstico em MS [43]. Sua frequência foi quase semelhante para os dois ecótopos e nenhuma amostra estava positiva para *T. cruzi*. Além disso, sua biologia e potencial vetorial são pouco conhecidos. *P. diasi* foi o mais frequente no ecótopo doméstico, apesar de seu número quase irrisório e ser uma espécie silvestre, já foi observado predomimantemente em ecótopo intradomiciliar [33]. Sua presença no estado já foi destacada [7] e sua distribuição compreende os estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Rio Grande do Norte, São Paulo

[4,13,44] e Tocantins [45]. Não se pode afirmar categoricamente que essas espécies tenham preferência pelo intradomicílio, haja vista que *T. sordida* foi encontrado principalmente em ecótopo intradomiciliar em estudo sobre triatomíneos no Distrito Federal, Brasil [33] - o que pode ser explicado por sua atração pela luz artificial das moradias - enquanto em Mato Grosso do Sul é principalmente peridomiciliar. Ademais, a maior frequência de triatomíneos no estado continua sendo peridomiciliar (85,06%).

T. sordida apresenta elevação em suas capturas ao longo dos meses do ano, iniciando em fevereiro e estendendo-se até o mês de outubro, quando tem início seu declínio (Fig 2). Esse aumento mais intenso ocorre durante os meses mais secos, característicos do inverno em Mato Grosso do Sul. A análise de regressão múltipla apontou que a variável UR média mensal afeta a população desse inseto fazendo com que diminua sua frequência conforme aumenta a UR (Fig 3). Assim, esse aumento da população na estação seca confirma a influência da UR sobre a distribuição de *T. sordida*, com esse preferindo regiões menos úmidas e com marcados períodos anuais de estações secas e chuvosas, como apontado por Forattini *et al.* [46]. A mesma influência inversa da UR sobre o aumento da população de triatomíneos foi observada para *T. matogrossensis* e *P. diasi*. Trabalhos já demonstraram que os triatomíneos sofrem influência de fatores ambientais como temperatura e umidade [47-49]. Esse trabalho demonstrou que isso é verdade para - além de *T. sordida* - *P. diasi*, *P. megistus* e *T. matogrossensis*. A variação da UR mensal tem maior efeito sobre a população de *T. matogrossensis*, enquanto a variação da UR ao longo dos anos e T no decorrer dos meses afeta a população de *P. diasi*. Pesquisas indicam que a T afeta diretamente a eclosão de ovos de *R. robustus* [49], *R. prolixus* [50] e *T. dimidiata* [51], mostrando que essa correlação entre variáveis climáticas e os triatomíneos capturados no MS estão relacionadas às maiores frequências de algumas espécies ao longo do tempo em determinadas regiões.

P. megistus sofreu influência direta da variação na UR média anual (Fig 2). A maior ocorrência dessa espécie foi nas regiões da Grande Dourados e Bolsão (Tabela 1). Ambas as regiões apresentam clima seco variando de quatro a cinco meses no ano, servindo como barreira natural à dispersão do inseto. Aragão [52] concluiu que essa espécie apresentava preferência por locais úmidos e que zonas climáticas mais áridas limitavam sua dispersão. Forattini *et al.* [46] também chegaram a conclusões semelhantes ao estudar *P. megistus*, assinalando a degradação ambiental e índices de UR como sinalizadores da distribuição desse vetor, com preferência por regiões

mais úmidas e quentes. Apesar de seu encontro em regiões menos antropizadas, sua frequência foi muito inferior, sugerindo sua domiciliação em épocas em que a UR e a degradação ambiental sejam maiores.

Como o impacto antrópico - principalmente eventos agropastoris, tal como o desmatamento - modifica os microclimas de um local e destroi o ambiente natural do inseto, a sua baixa frequência em ecótopo domiciliar pode ser explicada por seu isolamento em áreas remanescentes de mata nativa ou secundária dessas regiões (Grande Dourados e Bolsão) onde predomina a agropecuária. Conforme ocorre a diminuição das regiões preservadas, tornando esses ecótopos menos úmidos, o triatomíneo pode procurar microclimas mais favoráveis a seu desenvolvimento e adotar um comportamento sinantrópico.

Outro fator que pode explicar as constantes capturas de triatomíneos ao longo dos anos pode ser o uso de inseticida (piretroides) e as condições em que esse é aplicado no ambiente. Fatores como T, UR e P podem acarretar em perda de eficácia do inseticida [53]. Obara *et al.* [54] observaram que as populações de *T. sordida* avaliadas em três estados da Região Centro Oeste brasileira apresentaram baixos níveis de resistência a piretroides. Entretanto, populações de alguns municípios do estado apresentaram maior probabilidade de evolução à resistência. Níveis incipientes de resistência a deltametrina (piretroide) foram observados em cinco populações provenientes do estado de Minas Gerais [55]. Assim, no estado, o controle vetorial pode estar sendo afetado principalmente pela T e UR, uma vez que a maioria das amostras apresentou correlação com essas variáveis ambientais, e a borrifação de inseticida para controle populacional de triatomíneos nos meses mais frios e secos seria a mais adequada por aumentar seu efeito residual.

Conclusões

Apesar de Mato Grosso do Sul ser considerado livre da transmissão vetorial endêmica, o persistente encontro de vetores naturalmente infectados por *T. cruzi* ainda é digno de atenção e as relações entre a entomofauna Triatominae e fatores climáticos poderão auxiliar nas ações de combate ao vetor no estado visto que é possível estabelecer um padrão de controle para as espécies com base na dinâmica temporal e ambiental dos locais de encontro dos triatomíneos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório Regional de Entomologia do Núcleo Regional de Saúde da Secretaria de Estado de Saúde, em especial a servidora pública Guiomara M. A. Gonçalves, pelos dados fornecidos para confecção deste trabalho.

Referências

1. Miles MA, Feliciangeli MD, Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* 2003; 7404:1444-1448.
2. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, *et al.* New consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 7:1051-1054.
3. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, *et al.* A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 2009; 6:641-655.
4. Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*. 2003; 202:1–36.
5. Forero D, Weirauch C, Baena M. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Tor realbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa*. 2004; 670:1–12.
6. Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop*. 2009; 110:88–100.
7. Almeida PS, Ceretti Júnior W, Obara MT, Santos HR, Barata JM. Survey of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) fauna in domestic environments and natural infection by Trypanosomatidae in the State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 4:374-380.
8. Cominetti MC, Andreotti R, Oshiro ET, Dorval MEMC. Epidemiological factors related to the transmission risk of *Trypanosoma cruzi* in a Quilombola community, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 5:575-581.

9. Cominetti MC, Almeida RF, Gonçalves GM, Andreotti R. Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2013; 3:277-280.
10. Cominetti MC, Csordas BG, Cunha RC, Andreotti R. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2014; 47:747-55.
11. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [Internet]. Brasília: IBGE. Available at: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ms>.
12. Secretaria de Estado de Meio Ambiente de Desenvolvimento Econômico (Semade) [Internet]. Campo Grande: Semade. Available at: <http://www.semade.ms.gov.br/estudo-da-dimesao/>.
13. Carcavallo RU, Rodrigues MEF, Galvão C, Rocha DS, Girón IG, Arocha MAO, *et al*. Habitats e fauna relacionada. In: Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, editors. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1997. pp. 107-244.
14. World Health Organization. Control of Chagas disease. Technical Report Series 905: 40-55, 2002.
15. Thomazini MJ, Thomazini APBW. Diversidade de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em inflorescências de *Piper hispidinervum* (C.D.C.). Neotrop Entomol. 2002; 3:27-34.
16. Silveira Neto S, Nakano O, Barbin D, Villa Nova NA. Manual de Ecologia dos insetos. São Paulo: Agronômica Ceres; 1976.
17. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) [Internet]. Dourados: Embrapa. Available at: http://www.cpa.embrapa.br/clima/?lc=site/banco-dados/base_dados.
18. Forattini OP. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. Rev Saude Publica. 1980; 6:964-968.
19. Klink CA, Machado RB. Conservation of the brazilian cerrado. Conservation Biology 2005; 19:707-713.
20. Sano EE, Rosa R, Brito JLS, Ferreira LG. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. Pesq Agropec Bras. 2008; 43:153-156.

21. Shiki S. Sistema agroalimentar no Cerrado brasileiro: caminhando para o caos? In: Silva JG, Shiki S, Ortega AC, editors. Agricultura, meio ambiente e sustentabilidade do Cerrado brasileiro. Uberlândia: UFU; 1997. pp. 135-165.
22. Toledo MJO, Kühl JB, Silva SV, Gasperi V, Araújo SM. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. *Rev Saude Publica* 1997; 3:197-203.
23. Minter DM. Effects on transmission to man of the presence of domestic animals in infested households. In: Pan American Health Organization, editor. New approaches in America Trypanosomiasis research. Belo Horizonte, Brasil; 1975. pp. 330-337.
24. Silveira Neto S, Monteiro RC, Zucchi RA, de Moraes RCB. Uso da análise faunística de insetos na avaliação do impacto ambiental. *Sci. Agric.* 1995; 52: 9-15.
25. Diotaiuti L. Importância atual e perspectivas de controle de *Triatoma sordida* em Minas Gerais. [PhD thesis]. [Belo Horizonte]: Universidade Federal de Minas Gerais. 1991.
26. Dias JCP. O controle da doença de Chagas no Brasil. In: Silveira AC, editor. El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una iniciativa internacional. 1991/2001. Uberaba: OPAS/OMS, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro; 2002. pp. 146-250.
27. Silveira AC, Feitosa VR, Borges R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/83, Brasil. *Rev Brasil Mal D Trop.* 36:15-312, 1984.
28. Silva IG, Salha LA. Aspectos da suscetibilidade dos triatomíneos ao *Trypanosoma cruzi* na busca de um modelo experimental. *Rev Patol Trop.* 2007 Apr. doi:10.5216/rpt.v23i1.20039.
29. Gurgel-Gonçalves R, Duarte MA, Ramalho ED, Romaña CA, Cuba CAC. Spatial distribution of Triatominae populations (Hemiptera: Reduviidae) in *Mauritia flexuosa* palm trees in Federal District of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004; 37:241-247.
30. Noireau F, Santos SM, Gumiel M, Dujardin JP, Soares MS, Carcavallo RU, *et al.* Phylogenetic relationships within the oliveirai complex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Infect Genet Evol.* 2002; 2:1–17.
31. Oliveira AW, Silva IG. Geographical distribution and indicators entomologic of sinantropic triatomines captured in the State of Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:204–208.

32. Silva RA, Bonifácio PR, Wanderley DMV. Chagas' disease in São Paulo State: a comparative study between systematic search and inhabitants' report of bugs in the area under entomological surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 3:653-659.
33. Maeda MH, Knox MB, Gurgel-Gonçalves R. Occurrence of synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the Federal District of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012; 45:71-6.
34. Jaramillo N, Castillo D, Wolff ME. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97:667-673.
35. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist*. 1979; 163:123–520.
36. Miles MA, Souza AA, Póvoa MM. Chagas disease in the Amazon Basin III, Ecotopes of ten triatomine species (Hemiptera, Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil: *J Med Entomol*. 1981; 18:266–278.
37. Omah-Maharaj I. Studies on vectors of *Trypanosoma cruzi* in Trinidad, West Indies: *Med Vet Entomol*. 1992; 6:115–120.
38. Valente VC. Potential for domestication of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the municipality of Muaná, Marajó Island, State of Pará, Brazil: *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94:399–400.
39. Valente VC, Valente SA, Noireau F, Carrasco HJ, Miles MA. Chagas disease in the Amazon Basin: Association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with domestic pigs. *J Med Entomol*. 1998; 35:99–103.
40. Angulo VM, Gutiérrez R, Rubio I, Joya M, Arismendi M, Esteban L, *et al*. Triatomíneos domiciliados y silvestres: impacto en la transmisión de la enfermedad de Chagas em Santander. In: Angulo VM, editor. *Control y manejo de la trypanosomiasis americana*. Bucaramanga: Centro de investigaciones en Enfermedades Tropicales; 1999, pp. 72–76.
41. Reyes-Lugo M, Rodríguez-Acosta A. Domiciliation of the sylvatic Chagas disease vector *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811 (Triatominae: Reduviidae) in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94:508.
42. Feliciangeli MD, Carrasco HN, Patterson JS, Suárez B, Martínez C, Medina M. Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 and *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma*

cruzi among inhabitants in El Guamito, Lara state, Venezuela. Am J Trop Med Hyg. 2004; 71:501–505.

43. Diotaiuti L, Dias JCP. Ocorrência e biologia de *Rhodnius neglectus*, Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte, Minas Gerais. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 79:293-301.

44. Obara MT, Barata JMS, Rosa JA, Ceretti Junior W, Almeida PS, Gonçalves GA, *et al.* Description of the female and new records of *Triatoma baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000 (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) from Mato Grosso do Sul, Brazil, with a key to the species of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex. Zootaxa. 2012; 3151:63–68.

45. Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhares M, Silveira AC, *et al.* The Epidemiologic Importance of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae) as a Chagas Disease Vector in Brazil: a Revision of Domiciliary Captures 1993-1999. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98:443-449.

46. Forattini OP, Ferreira OA, da Rocha e Silva EO, Rabello EX. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. VI - Persistência do *Triatoma sordida* após alteração ambiental e suas possíveis relações com a dispersão da espécie. Rev Saude Publica. 1974; 8:265-82.

47. Juarez E; de Castro Silva EP. The behavior of *Triatoma sordida* under laboratory conditions. Rev Saude Publica. 1982; 16:1-36.

48. Feliciangeli MD, Rabinovich J. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions II. *Triatoma maculata*. J Med Entomol. 1985; 22:43-48.

49. Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU, Cunha V, Galvão C. Influence of the temperature and humidity on the biology of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954, in laboratory conditions (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Soc Bras Med Trop. 2001; 34: 357-363.

50. Gómes-Núnes JC. Resting places, dispersal and survival of Co⁶⁰ tagged adult *Rhodnius prolixus*. J Med Entomol. 1969; 6:83-86.

51. Zeledon R, Guardia VM, Zúñiga A, Swartzwelder JC. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) I. Life cycle, amount of blood ingested, resistance to starvation and size of adults. J Med Ent. 1970; 7:313-9.

52. Aragão MB. Aspectos climáticos da doença de Chagas. II - Área de ocorrência do *Panstrongylus megistus* (Burmeister ,1935). Rev. Brasil. Mal. D. Trop. 1961; 13:171-193.
53. Pinchin R, Fanara DM, Oliveira Filho AM. A village scale trial of Pirimiphos-methyl (OMS 1424), wettable power and slow-release formulations, in comparison with HCH for the control of *Triatoma infestans* in Brazil. World Health Org. 1984; VBC/82.840. 8p.
54. Obara MT, Otrera VCG, Gonçalves RG, dos Santos JP, Santalucia M, da Rosa JA, *et al.* Monitoring the susceptibility of *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) to deltamethrin insecticide, in Central-Western Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44:206-212.
55. Pessoa GCA. Monitoramento da suscetibilidade ao piretroide deltametrina em populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae). [M.Sc. Thesis]. [Belo Horizonte]: Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz; 2008. 95 p.

6 DISCUSSÃO

O exame microscópico (EM) de material a partir do trato digestivo dos triatomíneos é rotineiramente realizado para monitorar a distribuição de protozoários flagelados (possivelmente *T. cruzi*). No entanto, a microscopia não permite a identificação precisa do *T. cruzi*, pois outras espécies de tripanossomas são morfologicamente indistinguíveis deste, gerando resultados falso-positivos. Além disso, a microscopia não detecta a presença dos flagelados em triatomíneos como PCR, evidenciado neste estudo.

Estudos mostraram que a PCR é mais eficaz na identificação do protozoário com taxas variando entre 14,5% e 34,9% (MACHADO; AYALA, 2001; YEO *et al.*, 2004).

Assim, o trabalho “Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil” apresentou a comparação entre a técnica para identificação do *T. cruzi* em triatomíneos utilizada oficialmente pela Secretaria de Saúde do Estado de Mato Grosso do Sul e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), contribuindo para a ampliação das informações quanto à frequência de triatomíneos positivos para *T. cruzi* no estado.

A diferença entre as técnicas, com respeito à frequência nos resultados positivos, foi de 8,4%. Embora este valor seja inferior ao de estudos anteriores (DORN *et al.*, 1999; PIZZARRO; LUCERO; STEVENS, 2007; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1996), a PCR ainda exibiu maior número de triatomíneos infectados por *T. cruzi* quando comparado ao EM. Além disso, este estudo mostrou que a proporção de falsos-negativos resultante do exame microscópico foi de aproximadamente 8,2%. Esses dados apontam que a frequência de insetos positivos no estado são subestimadas.

O exame de ninfas de primeiro e segundo estádios é virtualmente impossível com a microscopia óptica devido à dificuldade em se coletar o conteúdo intestinal de insetos tão pequenos, principalmente quando não estão ingurgitadas. Isso pode ser contornado com o uso da PCR, que pode inclusive ser utilizada em material fixado em lâmina de microscopia com prévia classificação inconclusiva para *T. cruzi*, e que teve a identificação confirmada pela PCR.

Embora a importância epidemiológica do EM seja clara em termos de controle do vetor da doença, a utilização de técnicas mais sensíveis como a PCR pode

aumentar a precisão da investigação epidemiológica, assegurando melhores resultados em termos de presença do parasito, e permitir melhor alocação recursos financeiros. Além disso, a PCR pode ser usada em inquéritos epidemiológicos de outros agentes de importância para a saúde pública.

Claramente, uma técnica de detecção não exclui a outra. A utilização de EM e PCR em conjunto resultará em maior eficácia na identificação de focos do parasita. No entanto, considerando que apenas o exame microscópico é utilizado como rotina no diagnóstico de *T. cruzi* em triatomíneos, podem surgir perguntas sobre a distribuição atual do parasito nos triatomíneos. Por exemplo, qual é a verdadeira distribuição de *T. cruzi* entre esses insetos vetores? Quais são as linhagens do parasito e sua ocorrência em triatomíneos no Mato Grosso do Sul?

Em vista disso, o artigo “Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil”, teve por objetivo identificar as linhagens de *T. cruzi*, também chamadas de unidades discretas de tipagem (DTU), em triatomíneos e sua distribuição no estado.

Para isso, amostras de DNA de 511 triatomíneos de 14 diferentes regiões do Mato Grosso do Sul foram examinadas, sendo que 100 (19,6%) foram confirmadas como positivas utilizando PCR com os iniciadores 121/122, que têm como alvo o ácido desoxirribonucleico cinetoplasto (kDNA) do parasito. Dessas, 12 (12%) foram amplificadas com iniciadores TcSC5D-fwd/TcSC5D-rev, que têm como alvo o gene TcSC5D.

T. sordida é a espécie com a maior variedade de DTUs (TcI, TcII e TcBat/TcVII). Como esta espécie é a mais frequente no estado, há maior probabilidade de encontro de DTU distintas.

A distribuição geográfica das DTU segue diferentes padrões, com TcI, TcII e TcBat/TcVII nas Regiões de Planejamento de Campo Grande e Grande Dourados, TcI predominantemente no Bolsão, e TcII no Pantanal. Além disso, a TcI foi a DTU mais frequente em triatomíneos, seguido de TcII e TcBat. A sobreposição de DTU pode resultar de uma variedade de intrincados tipos de dispersão do parasito devido aos mecanismos peculiares de reinfestação do vetor (SCHACHTER-BROIDE *et al.*, 2009), à grande variedade de hospedeiros - abundantes e notáveis no Cerrado (MACHADO; AYALA, 2001) - e a heterogeneidade do ambiente (VAZ; D'ANDREA; JANSEN, 2007).

As regiões de planejamento de Campo Grande e Grande Dourados tiveram a maior variedade de DTU, apresentando TcI, TcII e TcBat/TcVII. *T. cruzi* é

extremamente bem-sucedido e as DTU encontradas neste trabalho são comuns no estado. Outros trabalhos já identificaram sua presença na região do Pantanal (MARCILI *et al.*, 2009b).

Tcl é uma DTU amplamente distribuída, com mais isolados na região amazônica (MAIA DA SILVA *et al.*, 2008; MILES *et al.*, 1981b). Embora Tcl também tenha sido encontrada no pantanal (MARCILI *et al.*, 2009b), esta DTU foi identificada infectando triatomíneos apenas nas regiões de planejamento de Campo Grande, Grande Dourados e Bolsão. A presença de Tcl em São Paulo (SP) (MARCILI *et al.*, 2009b) e Minas Gerais (MG) (VIANA, 2001), estados vizinhos à região do Bolsão, e na cidade de Aparecida do Taboado, também já foi identificada. O encontro de apenas Tcl na área oriental de MS pode estar associado a maior antropização dessa região (MACHADO *et al.*, 2004), com grandes formações agropastoris que reduzem a disponibilidade de alimento para os triatomíneos.

Mesmo sendo predominantemente silvestre, Tcl pode estar envolvida com a manifestação de formas graves da doença de Chagas, especialmente quando ocorre coinfeção em seres humanos com diferentes DTU (BURGOS *et al.*, 2010; DEL PUERTO *et al.*, 2010). Na comunidade de Furnas do Dionísio, município de Jaraguari, região de planejamento de Campo Grande, foram identificados Tcl em triatomíneos (COMINETTI *et al.*, 2013), TcII em morcegos (dados não mostrados) e TcIII foi identificado por Marcili *et al.* (2009c) em cães na comunidade. Assim, a situação epidemiológica dessa localidade chama a atenção por estar localizada entre colinas dominadas por vegetação de cerrado, o que resulta em alta frequência de insetos e um grande número de ecótopos naturais e artificiais. Além disso, a seguinte questão deve ser levantada: existe sobreposição entre os ciclos peridomésticos e silvestres que poderia levar a um intercâmbio entre os tipos de *T. cruzi* encontrados na área? Estudos eco-epidemiológicos e moleculares são necessários nesta região para elucidar esta questão.

A incidência de TcII foi maior a oeste, na região do Pantanal, semelhante aos resultados em animais silvestres (HERRERA *et al.*, 2008b; MARCILI *et al.*, 2009b). Uma possível explicação para isso é que a região é mais preservada (em relação ao leste do estado), levando a um aumento da oferta de hospedeiros como fontes de alimento para os triatomíneos, facilitando, assim, a circulação do parasito. Apesar disso ser apenas uma hipótese, mais estudos poderão confirmá-la ou refutá-la. No

entanto, como a dispersão e isolamento de *T. cruzi* são limitados pela dispersão dos seus hospedeiros, essa ideia merece maior atenção.

TcBat/TcVII, uma linhagem que, até agora, só havia sido encontrada em morcegos e uma criança (RAMIREZ *et al.*, 2013), foi identificada em *T. sordida* e constitui o primeiro relato de infecção natural em triatomíneos. Este encontro aumenta a distribuição desta DTU no estado, uma vez que foi descrita anteriormente apenas na região do Pantanal de MS (MARCILI *et al.*, 2009a; CAVAZZANA *et al.*, 2010). No entanto, é esperada maior incidência desta DTU uma vez que é mais estreitamente relacionada com TcI, a DTU mais amplamente distribuída no estado.

Como até o presente não havia um trabalho que correlacionasse a frequência de triatomíneos com variáveis climáticas em Mato Grosso do Sul, o artigo “Entomofauna Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) em Mato Grosso do Sul, Brasil, e influência de elementos climáticos sobre a estrutura de suas populações”, constitui um estudo importante para auxílio no controle vetorial de *T. cruzi* e teve por objetivo estudar a entomofauna de triatomíneos capturada no período de 2006 a 2009 em Mato Grosso do Sul e a influência da temperatura (T), umidade relativa do ar (UR) e precipitação (P) sobre suas populações.

Dos 14.178 espécimes de triatomíneos coletados, foram identificadas as espécies: *T. sordida*, a espécie mais capturada (13.642 – 96,22%), seguida de *R. neglectus* (217 – 1,53%), *P. geniculatus* (158 – 1,11%) e *T. matogrossensis* (99 – 0,70%). *T. baratai*, *Panstrongylus diasi* e *P. megistus* perfizeram um total de 62 exemplares (0,44%).

T. sordida foi a espécie predominante, visto que seus índices faunísticos de abundância, frequência, constância e dominância foram os maiores em relação aos outros triatomíneos capturados. É uma espécie nativa do Cerrado, bioma predominante de Mato Grosso do Sul. Triatomíneo com baixa frequência intradomiciliar (12,97%), concordando com outros trabalhos que já mostraram que *T. sordida* é predominantemente peridomiciliar em MS (ALMEIDA *et al.*, 2008; COMINETTI *et al.*, 2011). Entretanto, a preferência alimentar pode estar mais relacionada à oportunidade do que uma tendência a determinada fonte alimentar (MINTER *et al.*, 1975).

Seu valor como vetor do *T. cruzi* tem sido tratado como de baixa relevância no estado. Explica-se isso devido a seus hábitos predominantemente ornitofílicos e sua reduzida taxa de infecção natural. Entretanto, Cominetti *et al.* (2011) sugerem que

essas taxas podem estar subestimadas. Além disso, deve-se considerar o fato de serem dados secundários e muitas amostras coletadas não terem sido analisadas por motivos diversos como, por exemplo, inseto morto e sem conteúdo intestinal, bem como falhas involuntárias no registro dos dados. Assim, muitos desses valores podem estar aquém da realidade e serem mais expressivos que os apresentados neste trabalho quanto a suas taxas de infecção.

T. sordida apresenta elevação em suas capturas ao longo dos meses do ano. Esse aumento mais intenso ocorre durante os meses mais secos, característicos do inverno em Mato Grosso do Sul. A UR afeta a população desse inseto fazendo com que diminua sua frequência conforme aumenta a umidade relativa. Esse aumento da população na estação seca confirma a influência da UR sobre a distribuição de *T. sordida*, com esse preferindo regiões menos úmidas e com marcados períodos anuais de estações secas e chuvosas, como apontado por Forattini *et al.* (1974). A mesma influência inversa da UR sobre o aumento da população de triatomíneos foi observada para *T. matogrossensis*.

T. matogrossensis já foi encontrado invadindo ambiente domiciliar e apresenta tendência à domiciliação (GURGEL-GONÇALVES *et al.*, 2004; SILVA; SALHA, 2007). Em trabalho anterior (ALMEIDA *et al.*, 2008) essa espécie não foi encontrada naturalmente infectada, porém, sua taxa de infecção (18,18%) no presente estudo chama a atenção e é motivo de preocupação. Apesar de ser uma espécie de ambiente rochoso e de ecótopo silvestre, 32,32% desses triatomíneos foram capturados em ecótopo domiciliar, o que se torna preocupante, pois é uma espécie com boa capacidade vetorial para *T. cruzi* (NOIREAU *et al.*, 2002).

P. megistus sofreu influência direta da variação na UR média anual com maior ocorrência dessa espécie nas regiões da Grande Dourados e Bolsão. Ambas as regiões apresentam clima seco variando de quatro a cinco meses no ano, servindo como barreira natural à dispersão do inseto. Aragão (1961) concluiu que essa espécie apresentava preferência por locais úmidos e que zonas climáticas mais áridas limitavam sua dispersão. Forattini *et al.* (1974) também chegaram a conclusões semelhantes ao estudar *P. megistus*, assinalando a degradação ambiental e índices de UR como sinalizadores da distribuição desse vetor, com preferência por regiões mais úmidas e quentes.

Como o impacto antrópico, principalmente eventos agropastoris, tal como o desmatamento, modifica os microclimas de um local e destrói o ambiente natural do

inseto, a sua baixa frequência em ecótopo domiciliar pode ser explicada por seu isolamento em áreas remanescentes de mata nativa ou secundária dessas regiões (Grande Dourados e Bolsão) onde predomina a agropecuária. Conforme ocorre a diminuição das regiões preservadas, tornando esses locais ecótopos menos úmidos, o triatomíneo pode procurar microclimas mais favoráveis a seu desenvolvimento e adotar um comportamento sinantrópico.

Outro fator que pode explicar as constantes capturas de triatomíneos ao longo dos anos pode ser o uso de inseticida (piretroides) e as condições em que esse é aplicado no ambiente. Fatores como T, UR e P podem acarretar em perda de eficácia do inseticida (PINCHIN; FANARA; OLIVEIRA FILHO, 1984). Obara *et al.* (2012) observaram que as populações de *T. sordida* avaliadas em três estados da Região Centro Oeste brasileira apresentaram baixos níveis de resistência a piretroides. Assim, o controle vetorial pode estar sendo afetado principalmente pela T e UR no estado, uma vez que a maioria das amostras apresentou correlação com essas variáveis ambientais, e a borrifação de inseticida para controle populacional de triatomíneos nos meses mais frios e secos seria a mais adequada por aumentar seu efeito residual.

Assim, o estudo da ecoepidemiologia da entomofauna Triatominae e distribuição populacional das discretas unidades de tipagem (DTU) de *Trypanosoma cruzi*, que constituíram os objetivos do presente trabalho, forneceram resultados favoráveis a implementação da identificação molecular do parasito, por meio da PCR, na rotina do monitoramento da distribuição de *T. cruzi*, possibilitando melhor compreensão da sua distribuição ao longo do estado.

Além disso, gerou subsídios para estudos eco-epidemiológicos de triatomíneos em Mato Grosso do Sul, ampliando o conhecimento da dinâmica populacional e podendo contribuir para uma maior eficácia no controle desses insetos.

7 CONCLUSÕES

A PCR mostrou-se mais eficaz que o exame microscópico na detecção e identificação de *T. cruzi* em triatomíneos, indicando que a frequência de insetos positivos pode estar subestimada no Estado.

Em Mato Grosso do Sul ocorrem três DTU nos triatomíneos: TcI nas regiões de Campo Grande, Grande Dourados e Bolsão, TcII nas regiões de Campo Grande, Grande Dourados e Pantanal e TcBat/TcVII na região de Campo Grande, sendo que nas regiões de Campo Grande e Grande Dourados ocorre sobreposição das três linhagens de *T. cruzi*.

Triatoma sordida é a espécie de triatomíneo predominante no estado, seguida por *R. neglectus*, *P. geniculatus*, *T. matogrossensis*, *T. baratai*, *P. diasi* e *P. megistus*. Esses insetos sofrem influência da umidade relativa do ar e da temperatura, mas as mesmas não afetam sua distribuição ao longo das regiões de Mato Grosso do Sul.

REFERÊNCIAS

- ABADH-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. A.; JARAMILLO, O. N.; GURGEL-GONÇALVES, R.; DIAS, F. B.; DIOTAIUTI, L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). **Acta Tropica**, v. 110, n. 2-3, p. 159-177, May/June 2008.
- AGUILAR, H. M.; ABAD-FRANCH, F.; DIAS, J. C.; JUNQUEIRA, A. C. V.; COURA, J. R. Chagas disease in the Amazon region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, s. 1, p. 47-56, Oct. 2007.
- ALMEIDA, P. S.; CERETTI JÚNIOR W.; OBARA, M. T.; SANTOS, H. R.; BARATA, J. M. Survey of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) fauna in domestic environments and natural infection by Trypanosomatidae in the State of Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 374-380, July/Ago. 2008.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.
- AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; ROJAS, A. Update on Chagas disease in Venezuela - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 99, v. 8, p. 781-787, Mar. 2004.
- ANONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, s. 1, p. 429-432, Sept. 1999.
- ARAUJO, C. A. C.; WANIEK, P. J.; XAVIER, S. C. C.; JANSEN, A. M. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 308-312, Jan. 2011.
- ARAGÃO, M. B. Aspectos climáticos da doença de Chagas. II - Área de ocorrência do *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1935). **Revista Brasileira de Malariologia**, v. 13, p. 171-193, jul./dez. 1961.
- BARNABÉ, C.; NEUBAUER, K.; SOLARI, A.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: presence of the two major phylogenetic lineages and of several lesser discrete typing units (DTU) in Chile and Paraguay. **Acta Tropica**, v. 78, n. 2, p. 127-137, Feb. 2001.
- BARRETT, T. V.; HOFF, R. H.; MOTT, K. E.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G.; TEIXEIRA, R.; de Souza, J. A. A.; SHERLOCK, I. A. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 1, p. 84-90, 1980.
- BORGES-PEREIRA, J.; ZAUZA, P. L.; GALHARDO, M. C.; NOGUEIRA, J. S.; PEREIRA, G. R. L.; CUNHA, R. V. Doença de Chagas na população urbana do Distrito Sanitário de Rio Verde, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 4, p. 459-466, set./out. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Proposta para a certificação da interrupção da transmissão vetorial da doença de Chagas por *Triatoma infestans* no Brasil.** Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Brasil livre da transmissão pelo *Triatoma infestans*,** 2006. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/maio_2006.pdf Acesso em: 17 nov. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica,** 7th ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estados@.** Brasília: IBGE, 2014. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ms>>, acesso em 18 de fevereiro de 2014.

BRASIL. Secretaria de Estado de Meio Ambiente de Desenvolvimento Econômico. **Estudo da Dimensão Territorial do Estado de MS: Regiões de Planejamento.** Campo Grande: Semade, 2015. Disponível em: <http://www.semade.ms.gov.br/estudo-da-dimesao/>, acesso em 15 de maio de 2015.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Guia Clima.** Dourados: EMBRAPA, 2015. Disponível em: <http://www.cpaembrapa.br/clima/?lc=site/banco-dados/base_dados>, acesso em 02 de junho de 2015.

BRENIERE, S. F.; MOROCHI, W.; BOSSENO, M. F.; ORDONEZ, J.; GUTIERREZ, T.; VARGAS, F.; YAKSIC, N.; NOIREAU, F. *Trypanosoma cruzi* genotypes associated with domestic *Triatoma sordida* in Bolivia. **Acta Tropica**, v. 71, n. 3, p. 269–283, Nov. 1998.

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterisation of large and small subunit rRNA and miniexon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 11, p. 1218-1226, Sept. 2001.

BROWN, B. E. **Atlas of new world marsupials.** Chicago: Field Museum of Natural History, 2004.

BURGOS, J. M.; BEGHER, S. B.; FREITAS, J. M.; BISIO, M.; DUFFY, T.; ALTCHER, J.; TEIJEIRO, R.; ALCOBA, H. L.; DECCARLINI, F.; FREILIJ, H.; LEVIN, M. J.; LEVALLE, J.; MACEDO, A. M.; SCHIJMAN, A. G. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 6, p. 1016-1018, Dec. 2005.

BURGOS, J. M.; DIEZ, M.; VIGLIANO, C.; BISIO, M.; RISSO, M. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 485–495, Sept. 2010.

BUSCAGLIA, C. A.; di NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 5, p. 419-427, Apr. 2003.

CAMARGO, M. E.; SILVA, G. R.; CASTILHO, E. A.; SILVEIRA, A. C. Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil 1975/1980. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 26, n. 4, p. 192-204, 1984.

CARCAVALLO, R. U.; JURBERG, J.; LENT, H. Filogenia dos Triatomíneos. In: CARCAVALLO R. U.; GIRÓN, I. G.; JURBERG, J.; LENT, H. (Org.). **Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 21, p. 925-969.

CARCAVALLO, R. U.; RODRIGUES, M. E. F.; GALVÃO, C.; ROCHA, D. S.; GIRÓN, I. G.; AROCHA, M. A. O.; MARTÍNEZ, A.; ROSA, J. A.; CANALE, D. M.; FARR, T. H.; BARATA, J. M. S. Habitats e fauna relacionada. In: CARCAVALLO R. U.; GIRÓN, I. G.; JURBERG, J.; LENT, H. (Org.). **Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 14, p. 561-600.

CARDINAL, M. V.; LAURICELLA, M. A.; CEBALLOS, L. A.; LANATI, L.; MARCET, P. L.; LEVIN, M. J.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E.; SCHIJMAN, A. G. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 13, p. 1533-1543, Nov. 2008.

CARRASCO, H. J.; TORRELLAS, A.; GARCÍA, C.; SEGOVIA, M.; FELICIANGELI, M. D. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 13, p. 1379-1384, Nov. 2005.

CATALÁ, S.; CROCCO, L. B.; MORALES, G. F. *Trypanosoma cruzi* transmission risk index (TcTRI): an entomological indicator of chagas disease vectorial transmission to humans. **Acta Tropica**, v. 68, p. 285-295, Dec. 1997.

CAVAZZANA, J. R. M.; MARCILI, A.; LIMA, L.; SILVA, F. M.; JUNQUEIRA, A. C.; VELUDO, H. H.; VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L.; PAIVA, F.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. **International Journal for Parasitology**. v. 40, n. 3, p. 345-55, Mar. 2010.

CEBALLOS, L. A.; CARDINAL, M. V.; VAZQUEZ-PROKOPEC, G. M.; LAURICELLA, M. A.; OROZCO, M. M.; CORTINAS, R.; SCHIJMAN, A. G.; LEVIN, M. J.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E. Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. **Acta Tropica**, v. 98, n. 3, p. 286-96, July 2006.

CERQUEIRA, R.; LEMOS, B. Morphometric differentiation between Neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). **Mammalia**, v. 64, n. 3, p. 319-327, Jan. 2000.

CHAVEZ, J. Ectoparasites of small mammals of the lower Urubamba Region, Peru In: ALONSO, A.; DALLMEIER, F.; CAMPBELL, P. (Ed.). **Urubamba: the biodiversity of a peruvian rainforest**. Washington: Smithsonian Institution/MAB, 2001. cap. 20, p. 195-203.

CHIURILLO, M. A.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; PERALTA, A.; DIAS, M.; GUEVARA, P.; AÑEZ, N.; RAMÍREZ, J. L. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 5, p. 775-779, Sept. 2003

COMINETTI, M. C. Figura 3 – *Triatoma sordida*, 2010.

COMINETTI, M. C.; ANDREOTTI, R.; OSHIRO, E. T.; DORVAL, M. E. M. C. Epidemiological factors related to the transmission risk of *Trypanosoma cruzi* in a Quilombola community, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 575-581, Sept./Oct. 2011.

COMINETTI, M. C.; ALMEIDA, R. F.; GONÇALVES, G. M.; ANDREOTTI, R. Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 277-280, May./Jun. 2013.

COMINETTI, M. C.; CSORDAS, B. G.; CUNHA, R. C.; ANDREOTTI, R. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 47, n. 6, p. 747-755, Nov./Dec. 2014.

COSENTINO, R. O.; AGÜERO, F. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, e1777, July. 2012.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A.; MILES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitology**, v. 18, n. 4, p. 171-176, Apr. 2002.

COURA, J. R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 30-33, jan./mar. 2003.

COURA, J. R. Chagas Disease: What is know and what is needed – a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, s. 1, p. 113-122, Oct. 2007.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, suppl. 1, p. 31-40, July 2009.

CRISANTE, G.; ROJAS, A.; TEIXEIRA, M. M. G.; AÑEZ, N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. **Acta Tropica**, v. 98, n. 3, p. 247-254, July 2006.

CURA, C. I.; MEJIA-JARAMILLO, A. M.; DUFFY, T.; BURGOS, J. M.; RODRIGUERO, M.; CARDINAL, M. V.; KJOS, S.; GURGEL-GONCALVES, R.; BLANCHET, D.; DE PABLOS, L. M.; TOMASINI, N.; SILVA, A.; RUSSOMANDO, G.; CUBA, C. A. C.; AZNAR, C.; ABATE, T.; LEVIN, M. J.; OSUNA, A.; GURTNER, R. E.; DIOSQUE, P.; SOLARI, A.; TRIANA-CHAVEZ, O.; SCHIJMAN, A. G. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 14, p. 1599–1607, July. 2010.

DEANE, M. P., JANSEN, A. M., MANGIA, R. H. R., GONCALVES, A. M. & MOREL, C. M. Are our laboratory — strains representative samples of *Trypanosoma cruzi* populations that circulate in Nature? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, supl. 0, p. 19-24, Jan. 1984.

DEANE, M. P.; LENZI, H. L.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 513-515, Oct./Dec. 1984.

DEL PUERTO, R.; NISHIZAWA, J. E.; KIKUCHI, M.; IIHOSHI, N.; ROCA, Y.; AVILAS, C.; GIANELLA, A.; LORA, J.; VELARDE, F. U.; RENJEL, L. A.; MIURA, S.; HIGO, H.; KOMIYA, N.; MAEMURA, K.; HIRAYAMA, K. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, May 2010.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in Vitro culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 1-12, Jan. 2003.

DEUTSCH, L. A.; PUGLIA, L. R. R. **Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo**. 2. ed. São Paulo: Globo, 1990.

di NOIA, J. M.; BUSCAGLIA, C. A.; de MARCHI, C. R.; ALMEIDA, I. C.; FRASCH, A. C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 4, p. 401-413, Feb. 2002.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J.; WANDERLEY, D. M. V.; SILVA, I. G.; DIOTAIUTI, L.; SALVATELLA, R. Papel dos vetores secundários na transmissão da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 1, p. 59, jan./mar. 1994.

DIAS, J. C. P.; DIOTAIUTI, L. Vetores secundários de la enfermedad de Chagas en el Brasil y perspectivas para su control. In: GUHL, F.; JARAMILLO, C. A. (Ed.). **Curso taller control de tripanosomiasis americana y leishmaniosis: aspectos**

biológicos, genéticos y moleculares. Santafé de Bogotá: Universidad de los Andes, 1998. p. 154-159.

DIAS, J. C. P. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 370-375, July/Aug. 2006.

DIAS, J. C.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 193-196, Mar./Apr. 2008.

DIAS, J. P.; BASTOS, C.; ARAÚJO, E.; MASCARENHAS, A. V.; MARTINS NETTO E.; GRASSI, F.; SILVA, M.; TATTO, E.; MENDONÇA, J.; ARAÚJO, R. F.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; ARAS, R. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 296-300, May/June 2008.

DIOSQUE, P.; BARNABE, C.; PADILLA, A. M.; MARCO, J. D.; CARDOZO, R. M.; CIMINO, R. O.; NASSER, J. R.; TIBAYRENC, M.; BASOMBRIIO, M. A. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 997-1003, Sept. 2003.

DIOTAIUTI, L.; LOIOLA, C. F.; FALCÃO, P. L.; DIAS, J. C. P. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 3, p. 237-245, May/June 1993.

DORN, P. L.; ENGELKE, D.; RODAS, A.; ROSALES, R.; MELGAR, S.; BRAHNEY, B.; FLORES, J.; MONROY, C. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 5, p. 740-745, May 1999.

DRUMMOND, A. J.; ASHTON, B. M. C.; HELED, J.; KEARSE, M.; MOIR, R.; STONESHAVAS, S. **Geneious v 4.8**. [Software]. 2009. Available at: <http://www.geneious.com/>. Acesso em 20 de janeiro de 2014.

DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J.; PANZERA, F. Les vecterus de la maladie de Chagas. Recherches Taxinomiques Biologiques et Genetiques. **Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Classe des Sciences Naturelles et Médicales**, v. 24, n. 5, p. 162, févr. 2000.

DVORAK, J. A., ENGEL, J. C., LEAPMAN, R. D., SWYT, C. R. & PELLE, P. A. *Trypanosoma cruzi*: elemental composition and heterogeneity of cloned stock. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 31, n. 1, p. 19-26, Oct. 1988.

FERNANDES, A. J.; DIOTAIUTI, L.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J.; CHIARI, E. Infecção natural das glândulas anais de gambás (*Didelphis albiventris*) pelo *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, MG. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 1, p. 87-93, jan./mar. 1989.

FERNANDES, A. J.; CHIARI, E.; RODRIGUES, R. R.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J. The importance of the opossum (*Didelphis albiventris*) as a reservoir for *Trypanosoma cruzi* in Bambuí, Minas Gerais State. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 81-85, Jan./Mar. 1991.

FERNANDES, A. J.; DIOTAIUTI, L.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J.; CHIARI, E. Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 4, p. 473-480, out./dez. 1994.

FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J. B.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. B.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 6, p. 807-811, June 1998a.

FERNANDES, O.; STURM, N. R.; DERRE, R.; CAMPBELL, D. A. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 129-133, Sept. 1998b.

FIOCRUZ, 2012. **Ciclo Evolutivo**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/>>, acesso em: 31 de agosto de 2012.

FORATTINI, O. P. Notícia sobre *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 9, p. 177-180, 1960.

FORATTINI, O. P.; FERREIRA, O. A.; DA ROCHA E SILVA, E. O.; RABELLO, E. X. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. VI - Persistência do *Triatoma sordida* após alteração ambiental e suas possíveis relações com a dispersão da espécie. **Revista de Saúde Pública**, v. 8, n. 3, p. 265-282, Sept. 1974

FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 6, p. 964-968, dez. 1980.

FREITAS, J. M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M.; Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 411-417, Nov. 2005.

FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES, O.; MACEDO, C. R.; PENA, S. D. J. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 3, p. 23, Mar. 2006.

GALVÃO, C.; CARVALHO, R.; ROCHA, D. S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and

their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, p. 1-36, May 2003.

GARZÓN, E. A.; BARNABÉ, C.; CÓRDOVA, X.; BOWEN, C.; PAREDES, W.; GÓMEZ, E.; OUAISSI, A.; TIBAYRENC, M.; GUEVARA, A. G. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 4, p. 378-382, July/Aug. 2002.

GAUNT, M; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 557-565, July/Ago. 2000.

GAUNT, M. W.; YEO, M.; FRAME, I. A.; STOTHARD, J. R.; CARRASCO, H. J.; TAYLOR, M. C.; MENA, S. S.; VEAZEY, P.; MILES, G. A. J.; ACOSTAK, N.; ARIASK, A. R.; MILES, M. A. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 936-939, Feb. 2003.

GONSALVES, T. C. M.; CUNHA, V.; OLIVEIRA, E.; JURBERG, J. Alguns aspectos da biologia de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, em condições de laboratório (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 275-280, mar./abr. 1997.

GRISARD, E. C.; CARVALHO-PINTO, C. J.; SCHOLZ, A. F.; TOMA, H. K.; SCHLEMPER JUNIOR, B. R.; STEINDEL, M. *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis marsupialis* in Santa Catarina and Arvoredo Islands, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 795-800, Nov./Dec. 2000.

GUHL, F.; SCHOFIELD, C. J. Population genetics and control of Triatominae. **Parasitology Today**, v. 12, n. 5, p. 169-70, May 1996.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? **Acta Tropica**, v. 119, n. 1, p. 1-4, July 2011.

GURGEL-GONÇALVES, R.; DUARTE, M. A.; RAMALHO, E. D.; ROMANHA, C. A.; CUBA, C. A. C. Spatial distribution of Triatominae populations (Hemiptera: Reduviidae) in *Mauritia flexuosa* palm trees in Federal District of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 37, n. 3, p. 241-247, May./June 2004.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. n. 41, p. 95-98, 1999.

HARRIS, M. B.; TOMAS, W. M.; MOURÃO, G.; SILVA, C. J.; GUIMARÃES, E.; SONODA, F. Desafios para proteger o Pantanal brasileiro: ameaças e iniciativas em conservação. **Megadiversidade**. v. 1, n. 1, p. 156-164, 2005.

HERRERA, L.; D'ANDREA, P. S.; XAVIER, S. C. C.; MANGIA, R. H.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park —Serra da Capivarall and its surroundings (Piauí, Brazil) an endemic area for Chagas

disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 5, p. 379-388, May 2005.

HERRERA, H. M.; ABREU, A. U. G. P.; KEUROGHLIAN, T. P.; FREITAS, A. M. JANSEN. The role played by sympatric collared peccary (*Tayassu tajacu*), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*), and feral pig (*Sus scrofa*) as maintenance hosts for *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma cruzi* in a sylvatic area of Brazil. **Parasitology Research**, n. 103, v. 3, p. 619-624, Aug. 2008a.

HERRERA, H. M.; LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; OLIFIERS, N.; BIANCHI, R. C.; ROCHA, F. L.; MOURÃO, G. M.; JANSEN, A. M. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1133-1139, Nov. 2008b.

HUTCHEON, J. M.; KIRSCH, J. A. W. A moveable face: deconstructing the Microchiroptera and a new classification of extant bats. **Acta Chiropterologica**. v. 8, n. 1, p. 1-10, Apr. 2006.

JÁCOMO, A. T. A. **Ecologia manejo e conservação do queixada *Tayassu pecari* no Parque Nacional das Emas e em propriedades rurais de seu entorno** 2004, 120 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

JANSEN, A. M.; SANTOS de PINHO, A. P.; LISBOA, C. V.; CUPOLILLO, E.; MANGIA, R. H.; FERNANDES, O. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, s. 1, p. 203-204, Sept. 1999.

LA FUENTE, A. L. C; CUNHA, V; ROCHA, N; LOPES, C. M.; NOIREAU, F. Comparative biology of the two sister species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 1, p. 15-18, Jan./Feb. 2010.

LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L. E.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D.; CHIARI, E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 435-441, Nov. 2001.

LAGES-SILVA, E.; RAMÍREZ, L. E.; PEDROSA, A. L.; CREMA, E.; GALVÃO, L. M. C.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2167-2171, June 2006.

LAURIA-PIRES, L.; BOGLIOLO, A. R.; TEIXEIRA, A. R. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients. II. Isozyme and RFLP characterizations. **Experimental Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 182-90, Mar. 1996.

LEGEY, A. P.; PINHO, A. P.; XAVIER, S. C. C.; MARCHEVSKY, R.; CARREIRA, J. C.; LEON, L. L.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* in marsupial didelphids (*Philander frenata* and *Didelphis marsupialis*): differences in the humoral immune response in

natural and experimental infections. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 241-248, Mar./Apr. 2003.

LEMOS, B.; CERQUEIRA, R. Morfological differentiation in the white-eared opossum group (Didelphidae: Didelphis). **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 83, n. 2, p. 354-369, May 2002.

LISBOA, C. V.; DIETZ, J.; BAKER, A. J.; RUSSEL, N. N.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at the Reserva Biológica de Poço das Antas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 445-452, July/Aug. 2000.

LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; HERRERA, H. M.; GERHARDT, M.; CUPOLILLO, E.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 156, n. 3-4, p. 314-318, Oct. 2008.

LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A.; CARRASCO, H. J.; LEWIS, M. D.; YEO, M.; VARGAS, J.; TORRICO, F.; DIOSQUE, P.; VALENTE, V.; VALENTE, S. A.; GAUNT, M. W. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. **PloS Pathogens**, v. 5, n. 5, May 2009.

LUQUETTI, A. O.; MILES, M. A.; RASSI, A.; de REZENDE, J. M.; de SOUZA, A. A.; PÓVOA, M. M.; RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 3, p. 462-470, 1986.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitology Today**, v. 14, n. 3, p. 119-124, Mar. 1998.

MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 1-12, Feb. 2004.

MACHADO, C. A.; AYALA, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 13, p. 7396-7401, June 2001.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P.; CALDAS, E.; GONÇALVES, D.; SANTOS, N.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Brasília: Conservation International do Brasil, 2004.

MARCILI, A. ***Trypanosoma cruzi*: diversidade, relações filogenéticas e padrões ecogeográficos de isolados silvestres** 2008, 70 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas/USP, São Paulo, 2008.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A. C.; VELUDO, H. H.; MAIA DA SILVA, F.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; NUNES, V. L.; TEIXEIRA, M. M. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 6, n. 136, p. 641-655, May 2009a.

MARCILI, A.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; JUNQUEIRA, A. C.; da SILVA, F. M.; PINTO, A. Y.; NAIFF, R. D.; CAMPANER, M.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 5, p. 615-23, Apr. 2009b.

MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; BATISTA, J. S.; JUNQUEIRA, A. C.; SOUZA, A. I.; da ROSA, J. A.; CAMPANER, M.; LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TcIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1265-74, Dec. 2009c.

MARINHO-FILHO, J. S.; RODRIGUES, F. H. G.; JUAREZ, K. M. The cerrado mammals: diversity, ecology and natural history. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The Cerrado of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. cap. 14, p. 266-284.

MARTINS, C. A. O. **Seqüências ORESTES (Open Reading Frame Expressed Sequence Tags) de *Trypanosoma cruzi* e Transcrição de DNA satellite** 2007. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química/USP, São Paulo, 2007.

MENDONÇA, M. B.; NEHME, N. S.; SANTOS, S. S.; CUPOLILLO, E.; VARGAS, N.; JUNQUEIRA, A.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V.; COURA, J. R.; ZINGALES, B.; FERNANDES, O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. **Parasitology**, v. 124, n. 2, p. 177–184, Feb. 2002.

MILES M. A.; TOYE, P. J.; OSWALD, S. C.; GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 217-225, 1977.

MILES, M. A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYE, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, n. 5656, p. 819-821, Apr. 1978.

MILES, M. A.; CEDILLOS, R. A.; PÓVOA, M. M.; SOUZA, A. A.; PRATA, A.; MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? **Lancet**, v. 317, n. 8234, p. 1338-1340, June 1981a.

MILES, M. A.; POVOA, M. M.; de SOUZA, A. A.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; KETTERIDGE, D. S. Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of

Trypanosoma cruzi zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 5, p. 667-674, 1981b.

MILES, M. A.; FELICIANGELI, M. D.; de ARIAS, A. R. American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **British Medical Journal**, v. 326, n. 7404, p. 1444–1448, June 2003.

MINTER, D. M. Effects on transmission to man of the presence of domestic animals in infested households. In: Pan American Health Organization (Org.). **New approaches in America Trypanosomiasis research**, Belo Horizonte, 1975. p. 330-337.

MOLYNEUX, D. H.; STILES, J. K. Trypanosomatid-vector interactions. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**, v. 71, Suppl. 1, p. 151-66, 1991.

MONTENEGRO, V. M.; JIMÉNEZ, M.; DIAS, J. C. P.; ZELEDÓN, R. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p.491-494, June 2002.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 11, p. 6810-6814, Nov. 1980.

NEIVA, A.; PINTO, C. Representantes dos gêneros *Triatoma* Lap, *Rhodnius* Stal encontrados no Brasil Central e Sul; observações biológicas e descrição de uma nova espécie. **Brasil Médico**, v. 37, p. 84-86, 1923.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W. N. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653-655, Apr. 2009.

NOIREAU, F.; ZEGARRA, M.; ORDOÑEZ, J.; GUTIERREZ, T.; DUJARDIN, J. P. Genetic structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera:Reduviidae) domestic populations from Bolivia: application on control interventions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 94, n. 3, p. 347-351, May/June 1999.

NOIREAU, F.; FLORES, R.; GUTIERREZ, T.; ABAD-FRANCH, F.; FLORES, E.; VARGAS, F. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 23-27, Jan. 2000.

NOIREAU, F.; SANTOS, S. M.; GUMIEL, M.; DUJARDIN, J. P.; SOARES, M. S.; CARCAVALLO, R. U.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogenetic relationships within the oliveirai complex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution**. v. 2, n. 1, p. 1–17, Oct. 2002.

OBARA, M. T.; BARATA, J. M. S.; ROSA, J. A.; CERETTI JUNIOR, W.; ALMEIDA, P. S.; GONÇALVES, G. A.; CAROLINA, D.; GURGEL-GONÇALVES, R. Description of the female and new records of *Triatoma baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000

(Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) from Mato Grosso do Sul, Brazil, with a key to the species of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex. **Zootaxa**. v. 3151, p. 63–68, 2012.

O'CONNOR, O.; BOSSENO, M. F.; BARNABÉ, C.; DOUZERY, E. J.; BRENIÈRE, S. F. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 5, p. 587-593, May 2007.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Iniciative del cono sur: estado actual de las acciones para la eliminación de la transmisión transfusional del *Trypanosoma cruzi***. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1992, p. 92-118.

PATTON, J. L.; SILVA, M. N. F.; MALCOLM, J. R. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 244, p. 1-306, Jan. 2000.

PATTON, J. L.; COSTA L. P. Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. In: JONES M. E.; DICKMAN C. R.; ARCHER M. (Ed.). **Predators with Pouchs: the biology of carnivorous marsupials**. Melbourne: CSIRO Press, 2003. cap 5, p. 63-81.

PELLI, A.; SILVA, M. A.; SARMENTO, F. R.; MARTINS, E.; MATA, A. S.; DOMINGUES, M. A.; RAMIREZ, L. E. Population parameters for *Triatoma sordida* Stal, 1859: the most frequent vector for Chagas disease in the Triângulo Mineiro (Heteroptera, Triatominae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 25-28, Jan./Feb. 2007.

PINCHIN, R.; FANARA, D. M.; OLIVEIRA FILHO, A. M. A village scale trial of Pirimiphos-methyl (OMS 1424), wettable power and slow-release formulations, in comparison with HCH for the control of *Triatoma infestans* in Brazil. **WHO**. Geneva: 1984.

PINHO, A. P.; CUPOLILLO, E.; MANGIA, R. H.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 509–514, Sept./Oct. 2000.

PINTO, P. L. S.; AMATO NETO, V.; NASCIMENTO, S. A. B.; SOUZA, H. B. W. T.; MIYAMOTO, A.; MOREIRA, A. A. B.; BRAZ, L. M. A. Observações sobre a viabilidade do *Trypanosoma cruzi* no caldo da cana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 325-327, set./out. 1980.

PINTO, A. Y.; VALENTE, S. A.; VALENTE, V. C. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 454-4560, Dec. 2004.

PIZARRO, J. C; LUCERO, D. E; STEVENS, L. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector, *Triatoma*

infestans: high rates found in Chuquisaca, Bolivia. **BMC Infectious Diseases**, v. 27, n. 7, p. 66, Jun 2007.

POMPILIO, M. A.; PANIAGO, A. M. M.; BORGES-PEREIRA, J.; SILVA, F. A. D.; SILVA, R. C. B.; LIMA, J. H. F. Análise clínica-epidemiológica de 200 casos de doença de Chagas atendidos no HU-UFMS de 1986-1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, supl. 1, p. 214, 1998.

POMPILIO, M. A.; DORVAL, M. E. M. C.; da CUNHA, R. V.; BRITTO, C.; BORGES-PEREIRA, J. Aspectos epidemiológicos, clínicos e parasitológicos da doença de Chagas em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 473-478, nov./dez. 2005.

POVOA, M. M.; de SOUZA, A. A.; NAIFF, R. D.; ARIAS, J. R.; NAIFF, M. F.; BIANCARDI, C. B.; MILES, M. A. Chagas disease in the Amazon basin IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazonas and Rondonia, Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 78, n. 5, p. 479-487, Oct. 1984.

RAMIREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E.; ALVARENGA-FRANCO, F.; MATOS, A.; VARGAS, N.; FERNANDES, O.; ZINGALES, B. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 84, n. 3, p. 189-198, Dec. 2002.

RAMÍREZ, J. D.; HERNÁNDEZ, C.; MONTILLA, M.; ZAMBRANO, P.; FLÓREZ, A. C.; PARRA, E.; CUCUNUBÁ, Z. M. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, n. 7, p. 477-479, Dec. 2013.

REITHINGER, R.; CEBALLOS, L.; STARIOLO, R.; DAVIES, C.; GÜRTLER, R. E. Chagas disease control: deltamethrin-treated collar reduce *Triatoma infestans* feeding success on dog. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 7, p. 502-508, July 2005.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RICHER, W.; KENGNE, P.; CORTEZ, M. R.; PERRINEAU, M. M.; COHUET, A.; FONTENILLE, D.; NOIREAU, F. Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. 6, p. 759-764, June 2007.

ROELLIG, D. M.; BROWN, E. L.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; STEURER, F. J.; YABSLEY, M. J. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1123-1125, July 2008.

ROSSI, R. V.; BIANCONI, G. V.; PEDRO, W. A. Ordem Didelphimorphia. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Org.). **Mamíferos do Brasil** Londrina: Nelio R. dos Reis, 2006. cap. 2, p. 28-67.

SALAZAR-SCHETTINO, P. M.; BUCIO, M. I.; CABRERA, M.; BAUTISTA, J. First Case of Natural Infection in Pigs. Review of *Trypanosoma cruzi* Reservoirs in Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 499-502, July/Aug. 1997.

SALAZAR, A.; SCHIJMAN, A. G.; TRIANA-CHÁVEZ, O. High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single iniciador-PCR minicircle signatures. **Acta Tropica**, v. 100, n. 1-2, p. 110-118, Nov. 2006.

SALAZAR, P. M.; ROJAS, G.; BUCIO, M.; CABRERA, M.; GARCÍA, G.; RUIZ, A.; GUEVARA, Y.; TAPIA, R. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies and associated risk factors among the population under 18 years of age in Veracruz, Mexico. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 22, n. 2, p. 75-82, Aug. 2007.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec. 1977

SCHACHTER-BROIDE, J.; GÜRTLER, R. E.; KITRON, U.; DUJARDIN, J. D. Temporal variations of wing size and shape of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Northwestern Argentina using geometric morphometry. **Journal of Medical Entomology**. v. 5, n. 6, p. 994-1000, Sept. 2009.

SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; JARAMILLO, A. M. M.; CURA, C.; AUTER, F.; VERON, V.; QVARNSTROM, Y.; DEBORGGRAEVE, S.; HIJAR, G.; ZULANTAY, I.; LUCERO, R. H.; VELAZQUEZ, E.; TELLEZ, T.; SANCHEZ LEON, Z.; GALVÃO, L.; NOLDER, D.; MONJE, R. U. M. I. M.; LEVI, J. E.; RAMIREZ, J. D.; ZORRILLA, P.; FLORES, M.; JERCIC, M. I.; CRISANTE, G.; AÑEZ, N.; DE CASTRO, A. M.; GONZALEZ, C. I.; ACOSTA VIANA, K.; YACHELINI, P.; TORRICO, F.; ROBELLO, C.; DIOSQUE, P.; TRIANA CHAVEZ, O.; AZNAR, C.; RUSSOMANDO, G.; BÜSCHER, P.; ASSAL, A.; GUHL, F.; SOSA ESTANI, S.; DASILVA, A.; BRITTO, C.; LUQUETTI, A.; LADZINS, J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n. 5, Jan. 2011.

SCHLEMPER JÚNIOR, B. R.; STEINDEL, M.; GARGIONI, R.; FARIAS, C. J. M.; OLIVEIRA, R.; TRIANON, J. A. X. Wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi* and their relations with human habitation in the island of Santa Catarina. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 14, n. 2, p. 91-96, June 1985.

SCHOFIELD, C. J. The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review. **Bulletin of Entomological Research**, v. 63, n. 3, p. 363-379, Sept. 1979.

SCHOFIELD, C. J. *T. cruzi* - the vector-parasite paradox. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 535-544, July/Aug. 2000.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583-588, Dec. 2006.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, n. 2, p. 88–100, May./Jun. 2009

SHADOMY, S. V.; WARING, S. C.; CHAPPELL, C. L. Combined use of enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry to detect antibodies to *Trypanosoma cruzi* in domestic canine in Texas. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 2, p. 313-319, Mar. 2004.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARCONDES, C. B.; GUEDES, L. A.; SIQUEIRA, G. S.; BARONE, A. A.; DIAS, J. C.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J. E.; PERES, B. A.; ARRUDA JÚNIOR, E. R.; LOPES, M. H.; SHIROMA, M.; CHAPADEIRO, E. 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, Sept./Oct. 1991.

SILVA, R. P. **Estudo sobre *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909) em área de Mato Grosso do Sul: casos humanos, reservatórios e transmissores** 1979, 83 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências/USP, São Paulo, 1979.

SILVA, A. V.; BOSCO, S. M. G.; LANGONI, H.; BAGAGLI, E. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 81-83, Jan. 2006.

SILVEIRA, A. C.; FEITOSA, V. R.; BORGES, R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/83, Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia de Doenças Tropicais**, v. 36, p. 15-312, 1984.

SILVEIRA, A. C.; Entomological survey (1975-1983). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, supl. 2, p. 26-32, 2011.

SIMMONS, N. B. Order Chiroptera. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (ed.) **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**, 3rd edn. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005, cap. 20, p. 312-525.

SIMON, M. F.; GREYER, R.; QUEIROZ, L. P.; SKEMA, C.; PENNINGTON, R. T.; HUGHES, C. E. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 48, n. 106, p. 20359-20364, Dec. 2009.

SOLARI, A.; CAMPILLAY, R.; ORTIZ, S.; WALLACE, A. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. **Experimental Parasitology**, v. 97, n.4, p. 226-233, Apr. 2001.

SOSA-JURADO, F.; ZUMAQUERO-RIOS, J. L.; CRUZ-GARCIA, A.; GUZMÁNBRACHO, C.; MONTEÓN, V. M. Biotic and abiotic factors determining seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies against in Central Region of Mexico (Palmar de Bravo, Puebla, Mexico). **Salud Pública de México**, v. 46, n. 1, p. 1-9, enero/feb. 2004.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 141-152, Dec. 1996.

SOUZA, M. A. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 205-210, 1999.

SOUSA, O. E.; SAMUDIO, F.; de JUNCÁ, C.; CALZADA, J. E. Molecular characterization of human *Trypanosoma cruzi* isolates from endemic areas in Panama. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 455-457, June 2006.

STEINDEL, M.; KRAMER, P. L.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; DE MORAES, M. H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C.; STOCO, P. H.; MURTA, S. M.; CARVALHO-PINTO, C. J.; GRISARD, E. C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n. 1, p. 25-32, Jan. 2008.

STEVENS, J. R.; GIBSON, W. The molecular evolution of trypanosomes. **Parasitology Today**, v. 15, n. 11, p. 432-437, Nov. 1999.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. Problemática vetorial da Doença de Chagas. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 11, n. 1, p. 44-47, jan./mar. 2004.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 101, v. 5, p. 463-491, Aug. 2006.

TEIXEIRA, A. R.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, n. 974, p. 788-798. Dec. 2006.

TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABÉ, C.; GUERRINI, F.; SKARECKY, D.; AYALA, F. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random iniciador DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 1335-1339, Feb. 1993.

TOLEDO, M. J. O.; KÜHL, J. B.; SILVA, S. V.; GASPERI, V.; ARAÚJO, S. M. Estudo sobre triatomíneos e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* no Estado do Paraná, sul do Brasil. Resultados preliminares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 3, p. 197-203, maio/jun. 1997.

THOMAZINI, M. J.; THOMAZINI, A. P. B. W. Diversidade de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em inflorescências de *Piper hispidinervum* (C.D.C.). **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 1, p. 27-34, Mar. 2002.

TRAVASSOS, L.; de FREITAS, J. F. T. Relatório da sexta excursão científica do Instituto Oswaldo Cruz, realizada á zona da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em Maio de 1942. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 37, n. 3, p. 259-286, 1942.

TRAVASSOS, L.; de FREITAS, J. F. T. Relatório da sétima excursão científica do Instituto Oswaldo Cruz, realizada a zona da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em Maio de 1942. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 38, n. 3, p. 385-412, 1943.

UMEZAWA, E.S.; SOUZA, A.I.; CANCINO, V.P.; FEITOSA, M.M.; MARCILI, A.; CAMARGO, L.M.A.; CAMACHO, A.; STOLF, A.M.S.; TEIXEIRA, M.M.G. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, v. 111, n. 1, p. 15–20, July 2009.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; D'AVILA, R. D.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES, S. J. R.; MOREIRA, M. C.; FILHO, G. B.; PENA, S. D. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1805-1809, May 2000.

VALADARES, H. M.; PIMENTA, J. R.; de FREITAS, J. M.; DUFFY, T.; BARTHOLOMEU, D. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHIARI, E.; MOREIRA, M. C.; FILHO, G. B.; SCHIJMAN, A. G.; FRANCO, G. R.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 7, p. 839-850, June 2008.

VALENTE, V. C. Potencial de domiciliação de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) no município de Muaná, Ilha de Marajó, nordeste do Estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 595-597, set./out. 1999.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; FRAIHA NETO, H. Considerations on the Epidemiology and Transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, s. 1, p. 395-398, Sept. 1999.

VAZ, V. C.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 134, n. 12, p. 1785-1793, Nov. 2007.

VIANA, E. N. **Dinâmica de reinfestações por triatomíneos e alterações ambientais na ecoepidemiologia da doença de Chagas em área de Triatoma sordida Stål 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) no norte de Minas Gerais, Brasil 2001**, 280 p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais/Instituto de Ciências Biológicas; Belo Horizonte, 2001.

VINHAES, M. C.; DIAS J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, s. 2, p. 7-12, 2000.

VIRREIRA, M.; SERRANO, G.; MALDONADO, L.; SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub) lineages in megacolon samples from bolivian patients. **Acta Tropica**, v. 100, n. 3, p. 252-255, Dec. 2006.

WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R.; YANEGA, D.; PODLIPAEV, S. A.; ZELEDÓN, R.; CAMPBELL, D. A.; MASLOV, D. A. Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. **Parasitology**, v. 129, n. 5, p. 537-547, Nov. 2004.

WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J. B.; CARDOSO, M. A.; OELEMANN, W.; MOREL, C. M. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples patients in a rural endemic area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 6, p. 771-777, Dec. 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Technical Report Series. Second report of the Expert Committee. **Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis**: Technical Report Series 905. Geneva: WHO, 2012.

XAVIER, S. S.; SOUSA, A. S.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C.; BÓIA, M. N.; COURA, J. R. Chronic chagasic cardiopathy in the Rio Negro, Amazon State. Report of three new autochthonous cases confirmed by serology, clinical examination, chest X-rays, electro and echocardiography. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 211-216, Mar./Apr. 2006.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SANCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G. A.; LÓPEZ, E.; GONZÁLEZ, N.; PATTERSON, J. S.; GAUNT, M. W.; de ARIAS, A. R.; MILES, M. A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 225-233, Feb. 2004.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SÁNCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G. A. J.; LÓPEZ, E.; GONZÁLEZ, N.; PATTERSON, J. S.; GAUNT, M. W.; ARIAS, A. R.; MILESA, M. A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *T. cruzi* I and armadillos hosts of *T. cruzi* II, including hybrids. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 225-233, Feb. 2005.

ZELEDÓN, R.; SOLANO, G.; SAENZ, G.; SWARTZWELDER, J. C. Wild reservoir of *Trypanosoma cruzi* with special mention of the opossum, *Didelphis marsupialis*, and its role in the epidemiology of Chagas' disease in an endemic area of Costa Rica. **The Journal of Parasitology**, Knoxville, v. 56, n. 1, p. 38-47, Feb. 1970.

ZELEDÓN, R. Hemoflagellates. In: Baron, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4. ed. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1996, cap. 82, p 4134-4164.

ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M. R. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, s. 1, supl. 159-164, 1999.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, Nov. 2009.