

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**DINÂMICA DO *Panstrongylus megistus* NOS CICLOS DE TRANSMISSÃO DE
Trypanosoma cruzi EM ÁREAS DE CERRADO E MATA ATLÂNTICA NO
ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL**

por

José Eloy dos Santos Júnior



Belo Horizonte
Fevereiro/2011

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**DINÂMICA DO *Panstrongylus megistus* NOS CICLOS DE TRANSMISSÃO DE
Trypanosoma cruzi EM ÁREAS DE CERRADO E MATA ATLÂNTICA NO
ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL**

por

José Eloy dos Santos Júnior

**Tese apresentada com vistas à obtenção
do Título de Doutor em Ciências na área
de concentração de Doenças Infecciosas
e Parasitárias.**

Orientação: Dra. Liléia Diotaiuti

**Belo Horizonte
Fevereiro/2011**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S237d Santos Júnior, José Eloy dos.
2011

Dinâmica do *Panstrongylus megistus* nos ciclos de transmissão de *Trypanosoma cruzi* em áreas de cerrado e mata atlântica no estado de Minas Gerais, Brasil / José Eloy dos Santos Júnior. – Belo Horizonte, 2011.

xxvii, 143 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 147 - 169

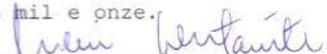
Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Doença de Chagas/transmissão 2. *Trypanosoma cruzi*/parasitologia 3. *Panstrongylus*/parasitologia 4. *Didelphis*/parasitologia I. Título. II. Diotaiuti, Líléia (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

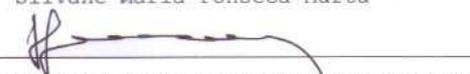
Ata da quadragésima quarta defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do aluno José Eloy dos Santos Júnior sob a orientação da Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti.

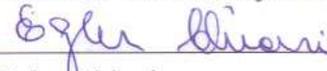
Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e onze, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da quadragésima quarta defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. A tese do aluno José Eloy dos Santos Júnior intitula-se "Dinâmica do *Panstrongylus megistus* nos ciclos de transmissão de *Trypanosoma cruzi* em áreas de cerrado e Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais, Brasil". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti - CPqRR/FIOCRUZ (orientadora/Presidente), Dra. Sílvia Ermelinda Barbosa Leite - CPqRR/FIOCRUZ (Titular), Dra. Silvane Maria Fonseca Murta - CPqRR /FIOCRUZ (Titular), Dr. Francois Louis Georges Marie Noireau - IRD/France (Titular) e Dr. Egler Chiari - UFMG (titular). Após arguir o aluno e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, o aluno foi considerado APROVADO. Uma vez encerrado o exame, eu, Liléia Gonçalves Diotaiuti, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e cinco de fevereiro de dois mil e onze.


Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti


Dra. Sílvia Ermelinda Barbosa Leite


Dra. Silvane Maria Fonseca Murta


Dr. Francois Louis Georges Marie Noireau


Dr. Egler Chiari

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fôra
A presença distante das estrelas!”*

Mario Quintana

In memmoriám ao Dr. François Noireau, mestre e amigo, que nos deixou a sós na busca dos hábitats silvestres de triatomíneos.

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, *Sueli* e *José Eloy*, pelo apoio, amor e paciência em todos os momentos da minha vida.

À minha mulher, *Christiane*, pelo amor e por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS (I)

À Dra. *Liléia Diotaiuti*, minha orientadora, pela amizade, apoio constante e por ter aberto esta importante porta na minha vida;

Ao Dr. *João Carlos Pinto Dias*, pela imensa colaboração neste trabalho, pela amizade, pelas inúmeras oportunidades nestes anos de convivência e, principalmente, pelo exemplo de humanidade e dedicação à ciência;

Aos colegas do Laboratório de *Triatomíneos e Epidemiologia da doença de Chagas* (LATEC) pelas colaborações nestes quatro anos do curso de doutorado;

Ao ecólogo *Guilherme magno Figueiredo Silva* pelas colaborações nas análises de Morfometria Geométrica;

À Dra. *Eliana Furtado, Fernanda Cardoso e Andresa Pain* pela realização das amostras sorológicas dos cães na Fundação Ezequiel Dias - FUNED;

À Dra. *Marta de Lana, Girley Francisco e Evandro Machado* do Laboratório de Doença de Chagas (UFOP) pelas amostras de controle de cães “chagásicos” e sugestões no início do projeto;

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma;

À equipe do Posto Avançado de Estudos Emmanuel Dias, em Bambuí, pelo apoio constante e amparo ao longo das saídas de campo;

Ao *Paulo Acácio Lamounier* pelo auxílio nas amostragens de campo em Bambuí;

À 3ª Gerência Regional de Saúde de Divinópolis, principalmente a *Janice Borba* e *Vicente Melo*, da pela amizade e grande auxílio na obtenção de dados de campo;

Ao *Ricardo Guimarães* pelas análises ambientais realizadas na tese;

Ao veterinário Dr. Gustavo Fontes Paz pela elucidação de diferentes questões sobre a manipulação de animais domésticos e silvestres;

Ao Instituto Estadual de Florestas (IEF), principalmente ao Tiago Carneiro e Camila Lopes pelas imagens de vegetação de Minas Gerais;

Ao Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo e a estudante Camila Paula Magalhães por contribuir nas análises associadas à doença de Chagas canina;

À Dra. Rosemere Duarte (ENSP/Fiocruz - RJ) pela realização das análises de fonte alimentar;

À amiga *Catarina Macedo* (Cata-ekeka) pela grande amizade e dicas para os trabalhos de campo;

Ao *Ronaldo Martins* e família pela amizade e apoio constante nas atividades de campo em Piracema;

Ao *Seu João* e *D. Marlene* pelo carinho, amizade e abrigo durante minhas idas a Piracema;

Aos famosos "*Serjão*" e *Isaque (Inháco)* pela ajuda nas amostragens de campo em Piracema;

Aos amigos de Porto Alegre *Daniela Fuhro*, *Julio Cesar "Bill"*, *Anelise Hahn*, *Leonardo Mendes*, *Mariah* e *Maria Ignez* que mesmo na distância se fizeram diariamente presentes na minha vida;

À Deus e a meus guias espirituais por me orientarem diariamente.

AGRADECIMENTOS (II)

Ao Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR-FIOCRUZ/MG), na pessoa do Dr. Rodrigo Correa, diretor do centro e todo o quadro de Pós-graduação, pela oportunidade que me foi concedida para fazer parte do quadro de alunos do Curso de Doutorado;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro ao projeto (Edital Univesal479759/2008-1);

À FAPEMIG pela disponibilização de uma bolsa de Iniciação Científica associada ao projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	xxi
RESUMO.....	xxvi
ABSTRACT	xxvii
1 INTRODUÇÃO	28
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 REVISÃO DE LITERATURA	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Áreas de estudo	44
4.2 Procedimentos Gerais.....	46
4.2.1 Coleta de dados do Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCH)..	46
4.2.2 Investigação do ambiente domiciliar e silvestre	47
4.2.2.1. Carretel de Rastreamento	48
4.2.2.2. Armadilhas de Noireau	49
4.2.2.3. Coleta de sangue em animais domésticos (cães e gatos)	52
4.2.3. Análises realizadas nos reservatórios e vetores amostrados nos municípios de Bambuí e Piracema	53
4.2.3.1 - Exames parasitológicos	53
4.2.3.2 - Caracterização molecular de tripanossomatídeos	55
4.2.3.3 - Análises sorológicas.....	57
4.2.3.4 - Análise da fonte alimentar.....	59
4.2.3.5 - Análise de morfometria geométrica.....	59
4.2.3.6 – Licenças para coleta de material biológico.....	61
5 RESULTADOS	62
5.1 Caracterização da infestação domiciliar e da dispersão de <i>Panstrongylus megistus</i> nas áreas de estudo a partir dos dados do Programa de Controle da doença de Chagas ao longo dos anos.....	62
5.2 Estudo da dinâmica de <i>Panstrongylus megistus</i> nas áreas de Cerrado e Mata Atlântica através da técnica de morfometria geométrica.	80

5.3. Avaliação da presença de ecótopos naturais de <i>Panstrongylus megistus</i> nos municípios de Bambuí e Piracema.	85
5.4 Identificação das diferentes fontes alimentares utilizadas por <i>Panstrongylus megistus</i> nos municípios estudados.	92
5.5 Determinação da interrelação entre os ambientes domiciliar e silvestre a partir dos índices de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> observados em reservatórios (domésticos e silvestres) e vetores encontrados nos municípios de Bambuí e Piracema.....	95
6 DISCUSSÃO	117
7 CONCLUSÕES	132
8. ANEXOS	133
8.1 – termo de consentimento utilizado para coleta de amostras de sangue dos cães nos municípios de Bambuí e Piracema.....	133
8.2 - Número de cães amostrados para as análises de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> nas nas diferentes localidades do município de Bambuí.....	135
8.3 - Número de cães amostrados para as análises de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> nas nas diferentes localidades do município de Piracema.....	137
8.4 - Menção honrosa recebida na 26 ^a Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas e 14 ^a Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, Uberaba, 2010.....	139
8.5 - Medalha de melhor trabalho no tema: Ecoepidemiologia - Simpósio Internacional Comemorativo do Centenário da Descoberta da doença de Chagas. Rio de Janeiro, 2009.....	140
8.6 - Publicado on line na página do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ/MG, para posterior publicação em livro da Editora FIOCRUZ em comemoração dos 100 anos da descoberta da doença de Chagas, 2009.	141
8.7 – Publicação de artigo científico na Revista das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz - 2011.	143
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

LISTA DE FIGURAS

Figura da capa – Foto ilustrada representando o ciclo silvestre do *Trypanosoma cruzi*

Figura 1 - Esquema do ciclo biológico do parasito *Trypanosoma cruzi*. As setas vermelhas indicam a multiplicação do protozoário no intestino do inseto vetor e as setas azuis, a multiplicação do protozoário dentro do hospedeiro humano (Fonte: CDC, 2011)29

Figura 2 – Distribuição de *Panstrongylus megistus* no Brasil (Área rachurada). As setas indicam os centros de endemismo e a dispersão na América Latina propostos para a espécie (Adaptado de Carcavallo *et al.* 1999 e Forattini 1980)34

Figura 3 – Mapa de localização de Bambuí (20°00'21" Sul, 45°58'37" Oeste) e Piracema (20°30'28" Sul; 44°28'57" Oeste), demonstrando a localização dos municípios nos biomas Cerrado e Mata Atlântica, respectivamente (Adaptado de Ecossistemas brasileiros, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, s.d.).....45

Figura 4 - Carretel de rastreamento utilizado na procura das tocas de gambás no meio silvestre (7 x 4 cm, 54 g). **A** - Carretel utilizado (seta indicando o orifício de saída da linha); **B** - *Didelphis albiventris* com carretel instalado; **C** - Gambá encontrado no ninho (seta indicando o carretel).....49

Figura 5 – Armadilhas de Noireau utilizadas na captura de triatomíneos. **A** – Armadilhas com camundongos colocados em frestas entre pedras. **B** e **C** - Adaptação com galinhas: colocadas em palmeiras e instaladas num oco de árvore, respectivamente.....50

Figura 6 - Determinação da idade dos gambás segundo a erupção e desgaste dos dentes: **A** - Jovem classe III; **B** - Adulto classe V; **C** - Adulto classe VII; **D** - Classes de idades para *D. albiventris*: I – erupção de dois pré-molares e dois molares, o primeiro decíduo; II – agregação de um terceiro molar; III – agregação de um quarto molar; IV – o primeiro molar (decíduo) é substituído por um terceiro pré-molar; V – erupção do último molar; VI e VII – cúspides dos caninos, pré-molares e molares

desgastados. FD = fórmula dentária. Adaptado de Schweigmann *et al.* (1999) e Tyndale-Biscoe & Mackenzie (1976).....51

Figura 7 - Asa esquerda de *Panstrongylus megistus* com os cinco Pontos Anatômicos de Referência (PAR) utilizados nas análises populacionais por morfometria geométrica.....60

Figura 8 - Número de unidades domiciliares (UDs) e localidades positivas com presença de *Panstrongylus megistus* no município de Bambuí, a partir dos dados do período inicial (1974-80), pesquisas integrais (1983 e 1990 – em destaque) e dados atuais (2004 a 2010). O índice de infestação está representado sobre as barras de UD's positivas dos anos 1983 e 1990 (Fonte: Programa de Controle da doença de Chagas).....64

Figura 9 – Notificações (Not) e atendimentos (Atend) associados ao intradomicílio (Intra) e peridomicílio (Peri) no município de Bambuí entre os anos de 2004 e 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).....65

Figura 10 – Número de *Panstrongylus megistus* capturados em notificações e atendimentos positivos no município de Bambuí entre os anos de 2004 e 2010. Em 2010 não houve atendimentos positivos (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).....66

Figura 11 – Distribuição sazonal de *Panstrongylus megistus* obtidos através de notificações e atendimentos no município de Bambuí entre os anos de 2004 e 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).....69

Figura 12 – Número de unidades domiciliares (UDs) e localidades positivas para *Panstrongylus megistus* entre os anos de 1976 e 1993 no município de Piracema. O índice de infestação está representado sobre as barras UD's positivas (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).....70

Figura 13 - <u>Notificações</u> (Not) e <u>atendimentos</u> (Atend) associados ao <u>intradomicílio</u> (intra) e <u>peridomicílio</u> (peri) no município de Piracema entre os anos de 2004 e 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).....	72
Figura 14 – Número de <i>Panstrongylus megistus</i> capturados em notificações e atendimentos positivos no município de Piracema entre os anos de 2004 e 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).....	73
Figura 15 - Distribuição sazonal de <i>Panstrongylus megistus</i> obtidos através de <u>notificações</u> e <u>atendimentos</u> no município de Piracema entre os anos de 2004 e 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).....	75
Figura 16 – Mapa da vegetação do município de Bambuí (referente ao ano de 2003), demonstrando os pontos georeferenciados das residências com notificações de <i>Panstrongylus megistus</i> entre os anos de 2004 e 2010 e sua proximidade com as diferentes classes de vegetação analisadas.....	76
Figura 17 - Avaliação da proximidade das residências com notificações de <i>Panstrongylus megistus</i> entre os anos de 2004 e 2010, com uma ou duas classes de vegetações analisadas no município de Bambuí.....	77
Figura 18 – Proximidade das diferentes classes de vegetações avaliadas de residências com notificações de <i>Panstrongylus megistus</i> entre os anos de 2004 e 2010 no município de Bambuí.....	78
Figura 19 – Mapa da vegetação do município de Piracema (referente ao ano 2003), demonstrando os pontos georeferenciados das residências com notificações de <i>Panstrongylus megistus</i> entre os anos de 2004 e 2010 e sua proximidade com as diferentes classes de vegetações analisadas.....	79
Figura 20 - Proximidade das diferentes classes de vegetações avaliadas de residências com notificações de <i>Panstrongylus megistus</i> entre os anos de 2004 e 2010 no município de Piracema.....	80

Figura 21 – Variação do tamanho centróide das asas entre os sexos e populações de <i>Panstrongylus megistus</i> de <u>BambuÍ</u> e <u>Piracema</u> . Os valores mostram a média, o máximo, o mínimo e quartis.....	81
Figura 22 – Variação do tamanho centróide das asas entre os sexos e populações de <i>Panstrongylus megistus</i> (AN – ambiente natural, AA – ambiente artificial) de <u>BambuÍ</u> e <u>Piracema</u> . Os valores mostram a média, o máximo, o mínimo e os quartis.....	82
Figura 23 – Variação do tamanho do centróide das asas de <i>Panstrongylus megistus</i> , entre os sexos e entre as populações (AN – ambiente natural, AA – ambiente artificial) de <u>Piracema</u> , com população AN reduzida. Os valores mostram a média, o máximo, o mínimo e os quartis.....	83
Figura 24 – Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma (CV1 e CV2) das asas de <i>Panstrongylus megistus</i> , mostrando a distribuição dos espécimes das populações associadas aos ambientes natural (AN) e artificial (AA) de <u>BambuÍ</u> e <u>Piracema</u> . As cores correspondem aos grupos analisados no modelo discriminante.....	84
Figura 25 - Número de ecótopos naturais identificados através de busca ativa no município de <u>BambuÍ</u> entre os meses de março/2008 e maio/2010.....	85
Figura 26 – Número de ecótopos naturais identificados através de busca ativa no município de <u>Piracema</u> entre os meses de março/2008 e maio/2010.....	86
Figura 27 – Número de ecótopos naturais encontrados durante as amostragens de campo, através do uso dos <u>carretéis de rastreamento</u> em <i>Didelphis albiventris</i> no município de <u>BambuÍ</u>	87
Figura 28 – Número de ecótopos naturais encontrados durante as amostragens de campo, através do uso dos <u>carretéis de rastreamento</u> em <i>Didelphis albiventris</i> e <i>Didelphis aurita</i> no município de <u>Piracema</u>	88

Figura 29 – Foco natural de *Panstrongylus megistus* encontrado no município de Bambuí. **A** - Árvore onde foi encontrada a colônia do barbeiro; **B** - Coleta de material do interior da árvore para triagem; **C** - instalação de armadilhas de Noireau com camundongos e galinhas; **D** - triagem do material; **E** - Captura de ninfa nas armadilhas com galinhas; **F** - Ninfas e ovos encontrados no ecótopo natural.....90

Figura 30 – Variáveis ambientais registradas através do equipamento HOBO sensor® do no ecótopo natural de *Panstrongylus megistus* (interior da árvore) e no ambiente externo (fora da árvore), durante cinco dias de amostragens (as observações foram realizadas a cada 15 min): **A** - Temperatura; **B** – Umidade.....91

Figura 31 – Ocorrência de hospedeiros presentes na análise de fonte alimentar realizada em *Panstrongylus megistus* obtidos através de notificações e atendimentos realizados no ambiente doméstico do município de Bambuí.....94

Figura 32 – Casas com presença de *Panstrongylus megistus* infectados por *Trypanosoma cruzi* (casas positivas) e índice de infecção dos barbeiros nos municípios de Bambuí e Piracema entre os anos de 2004 a 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).....96

Figura 33 – Perfil de amplificação do DNA satélite de *T. cruzi*, a partir da análise do sangue total de *Didelphis albiventris* capturados no município de Bambuí. PM = Peso molecular Φ X174, CN = controle negativo (sem DNA), 1 a 6 = *D. albiventris* com análises parasitológicas positivas para *T. cruzi* (1 e 2 não detectaram o parasito), 7 a 11 = *D. albiventris* com análises parasitológicas negativas. Controles positivos: TCI = cepa colombiana, TCII = cepa Y.....106

Figura 34 – Filhotes encontrados no marsúpio de *Didelphis albiventris* em captura durante o verão no município de Bambuí (entre 60 e 70 dias de vida).....108

Figura 35 - Perfil de amplificação do DNA satélite de *T. cruzi*, a partir da análise do sangue total de *Didelphis albiventris* capturados no município de Piracema. PM = Marcador molecular Φ X174, CN = controle negativo (sem DNA), 1 a 5 = *D. albiventris* com análises parasitológicas positivas para *T. cruzi*, 6 a 9 = *D. albiventris* com análises parasitológicas negativas. Controles positivos: TCI = cepa colombiana, TCII = cepa Y.....114

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - INTERPRETAÇÃO DO COEFICIENTE KAPPA.....	54
TABELA 2 - NOTIFICAÇÕES DE BARBEIROS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ NA DÉCADA DE 70 (1974-75, 1977-78 E 1979-80) (FONTE: PAEED)	63
TABELA 3 - NÚMERO DE <i>Panstrongylus megistus</i> (MACHOS, FÊMEAS E NINFAS) CAPTURADOS NOS DIFERENTES ECÓTOPOS <u>INTRADOMICILIARES</u> E <u>PERIDOMICILIARES</u> , A PARTIR DE NOTIFICAÇÕES E ATENDIMENTOS REALIZADAS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ, ENTRE OS ANOS DE 2004 E 2010 (FONTE: PROGRAMA DE CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS).....	67
TABELA 4 - OCORRÊNCIA DE <i>Panstrongylus megistus</i> A PARTIR DE DADOS OBTIDOS NAS DIFERENTES AVALIAÇÕES (AV) REALIZADAS (1979-1981 E 1989-1993) NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.....	71
TABELA 5 - NÚMERO DE <i>Panstrongylus megistus</i> (MACHOS, FÊMEAS E NINFAS) CAPTURADOS NOS DIFERENTES ECÓTOPOS <u>INTRADOMICILIARES</u> E <u>PERIDOMICILIARES</u> , A PARTIR DE NOTIFICAÇÕES E ATENDIMENTOS REALIZADAS NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA, ENTRE OS ANOS DE 2004 E 2010 (FONTE: PROGRAMA DE CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS).....	74
TABELA 6 - PARÂMETROS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA OBSERVADOS NA PARTE INTERNA E EXTERNA (AMBIENTE) DA ÁRVORE COM COLÔNIAS NATURAIS DE <i>Panstrongylus megistus</i>	92
TABELA 7 - FONTES ALIMENTARES DE <i>Panstrongylus megistus</i> OBTIDOS ATRAVÉS DE NOTIFICAÇÕES E ATENDIMENTOS REALIZADOS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.	93
TABELA 8 - ANÁLISES SOROLÓGICAS, PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES REALIZADAS NOS CÃES AMOSTRADOS NAS ZONAS URBANAS E RURAIS DO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.	98

TABELA 9 – ANÁLISES SOROLÓGICAS, PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES REALIZADAS NOS CÃES AMOSTRADOS NAS ZONAS URBANAS E RURAIS DO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.....	100
TABELA 10 – ANÁLISES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES REALIZADAS EM GATOS DOMÉSTICOS CAPTURADOS EM DIFERENTES LOCALIDADES DO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.	101
TABELA 11 - TESTES PARASITOLÓGICOS E MOLECULARES REALIZADOS EM GATOS AMOSTRADOS NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.....	102
TABELA 12 - NÚMERO DE ARMADILHAS INSTALADAS POR LOCALIDADES NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ E NÚMERO DE INDIVÍDUOS CAPTURADOS.....	103
TABELA 13 - NÚMERO DE ESPÉCIES CAPTURADAS NOS AMBIENTES PERIDOMICILIAR E SILVESTRE NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.....	104
TABELA 14 - NÚMERO DE ESPÉCIES CAPTURADAS E INFECTADAS POR <i>Trypanosoma cruzi</i> NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.....	105
TABELA 15 - ANÁLISES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES REALIZADAS EM <i>Didelphis albiventris</i> CAPTURADOS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.....	105
TABELA 16 - ANÁLISES DE CONCORDÂNCIA ENTRE OS DOIS TESTES PARASITOLÓGICOS REALIZADOS E A ANÁLISE MOLECULAR POR PCR-MULTIPLEX NOS <i>Didelphis albiventris</i> CAPTURADOS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.....	106
TABELA 17 - ÍNDICES DE CAPTURAS REALIZADAS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.....	107
TABELA 18 - CARATERIZAÇÃO DAS CAPTURAS DE MARSUPIAIS E ROEDORES AO LONGO DAS ESTAÇÕES DO ANO, INDICANDO O NÚMERO DE ANIMAIS INFECTADOS POR <i>Trypanosoma cruzi</i> NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.....	108

TABELA 19 – NÚMERO DE FILHOTES DE <i>Didelphis albiventris</i> ENCONTRADOS COM AS FÊMEAS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ NAS ESTAÇÕES DE PRIMAVERA E VERÃO.....	109
TABELA 20 - NÚMERO DE ARMADILHAS INSTALADAS E INDIVÍDUOS CAPTURADOS POR LOCALIDADE NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.....	110
TABELA 21 - ESPÉCIES CAPTURADAS NO AMBIENTE PERIDOMICILIAR E SILVESTRE NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.....	111
TABELA 22 - NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS PARA INFECÇÃO POR <i>Trypanosoma cruzi</i> ATRAVÉS DOS TESTES DE XENODIAGNÓSTICO E HEMOCULTURA NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.	112
TABELA 23 - ANÁLISES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES (PCR-MULTIPLEX) REALIZADAS EM GAMBÁS <i>Didelphis albiventris</i> E <i>Didelphis aurita</i> NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.....	113
TABELA 24 - ANÁLISES DE CONCORDÂNCIA ENTRE A PCR-MULTIPLEX E OS GAMBÁS (<i>Didelphis albiventris</i> E <i>Didelphis aurita</i>), CAPTURADOS NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.....	113
TABELA 25 - ÍNDICES DE CAPTURAS DE MARSUPIAIS E ROEDORES NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA AO LONGO DAS ESTAÇÕES DO ANO.....	114
TABELA 26 - CARATERIZAÇÃO DAS CAPTURAS DE RESERVATÓRIOS SINANTRÓPICOS E SILVESTRES AO LONGO DAS ESTAÇÕES DO ANO, INDICANDO O NÚMERO DE ANIMAIS INFECTADOS POR <i>Trypanosoma cruzi</i> NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.....	115
TABELA 27 - NÚMERO DE FILHOTES DE <i>Didelphis albiventris</i> ENCONTRADOS COM AS FÊMEAS NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA NAS ESTAÇÕES DE INVERNO E PRIMAVERA	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

≥ - Maior ou igual

> - Maior

< - Menor

°C - Graus Celsius

μL - Microlitro

μM - Micromolar

♀ - Feminino

♂ - Masculino

Φ = Phi, 21^o letra do alfabeto grego

AA - Ambiente artificial

ACPs - Análises de componentes principais

AGP - Análise Generalizada de Procrustes

AN - Ambiente Natural

Atend - Atendimento

AV - Avaliações

BHC – *benzene* - hexachloride ou Gammexane[®] P. 530

CEPMCh - Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de Chagas

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

cm – Centímetro

CN = controle negativo

CP - Componentes principais

CPqRR - Centro de Pesquisas René Rachou

CV – Variáveis Canônicas

DCh - Doença de Chagas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS – Continuação

- DENERu** - Departamento Nacional de Endemias Rurais
- DNA** - *Desoxiribonucleic acid* (ou ácido desoxirribonucléico)
- dNTP** = desoxirribonucleotídeos
- DTUs** - *Discret Taxonomic Units* (ou Unidades Taxonômicas Discretas)
- EDTA** - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ou Ácido etilendiamino tetra-acético)
- EIE** - Ensaio Imunoenzimático
- ELISA** - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ou ensaio imunoenzimático)
- ENSP** - Escola Nacional de Saúde Pública
- FA** – Fonte Alimentar
- FD** - Fórmula dentária
- FIOCRUZ** - Fundação Oswaldo Cruz
- FUNASA** - Fundação Nacional da Saúde
- FUNED** - Fundação Ezequiel Dias
- g** - Grama
- GPS** - *Global Position System* (ou Sistema de Posicionamento Global)
- GRS** - Gerência Regional de Saúde
- h** - Hora
- HAI** - Teste de Hemaglutinação Indireta
- HEMO** – Hemocultura
- IBAMA** - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
- IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IEF** - Instituto Estadual de Florestas
- IFI** - Imunofluorescência indireta
- IID** - Índice de Infestação Domiciliar
- INCOSUR** - Iniciativa Intergubernamental del Cono Sur

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS – Continuação

Intra - Intradomicílio

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

KCl - Cloreto de Potássio

km e **km²** – Quilômetro e quilômetro quadrado

LATEC - Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas

LEISH - Leishmaniose

LIT - *Liver Infusion Tryptose*

local. - localidade

LT - Levantamento triatomínico

m - Metro

MANCOVA - *Multivariate Analysis of Co-variance* (ou Análise Multivariada de Co-variância)

Máx. = máximo

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

min. - Minuto

mL – Mililitro

mM - Milimolar

mm = milímetro

MRA – Multi-epitope Recombinant Antigens

NNN/LIT = Novy, McNeal & Nicole/ *Liver Infusion Tryptose*

Not - Notificação

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

PAEED - Posto Avançado de Estudos Emmanuel Dias

PAR - Pontos anatômicos de referências

pb - pares de base

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS – Continuação

PBS - *Phosphate-Buffered Saline* (ou Solução Tampão)

PCDCH - Programa de Controle da Doença de Chagas

PCR - *Polimerase Chain Reaction* (ou Reação em Cadeia da Polimerase)

Peri - Peridomicílio

pH - Potencial hidrogeniônico

PI - Pesquisa integral

PM - Peso molecular

pmoles – picomoles

q.s.p. = quantidade suficiente para

® - Marca registrada

RAPD - *Random Amplification of Polymorphic DNA* (ou amplificação aleatória de polimorfismos de DNA).

RF - Reações fracas

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

rpm - Rotações por minuto

S - Latitude Sul

s – Segundos

SMS – Secretaria Municipal de Saúde

SNM - Serviço Nacional de Malária

SUCAM - Superintendência de Campanhas de Saúde Pública

Taq - derivado de *Thermusaquaticus* (bactéria extremófila)

TC - Tamanho centroide

TCI e TCII – *Trypanosoma cruzi* I e II

Tris-HCl – Tris-hidroclorídrico (Ácido clorídrico + Tris base)

U - Unidades

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS – Continuação

UDs - Unidades domiciliares

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

UR - Umidade Relativa

VE - Vigilância epidemiológica

vol - Volume

W - Longitude Oeste

XENO – Xeniagnóstico

RESUMO

O triatomíneo *Panstrongylus megistus* pode ser encontrado ao longo do Brasil em um diversificado número de habitats, tanto silvestres como artificiais. Este trabalho teve como objetivo estudar a dinâmica populacional de *P. megistus* nos ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* em áreas de Cerrado e Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais/ Brasil. Os municípios estudados foram Bambuí (Cerrado) e Piracema (Mata Atlântica). Foram realizadas coletas nos ambientes natural e artificial, com objetivo de identificar a dinâmica populacional, as fontes alimentares (FA) e os ecótopos naturais utilizados por *P. megistus*, bem como caracterizar a interrelação dos ciclos de transmissão do *T. cruzi* a partir dos reservatórios e vetores associados. As amostragens de campo foram realizadas em locais de maior presença do barbeiro e proximidade de áreas naturais. A partir dos dados avaliados foi observado o sucesso das atividades de controle vetorial, alcançadas em momentos diferentes em cada município. Através da análise por morfometria geométrica, foi possível identificar uma semelhança entre as populações doméstica e silvestre de *P. megistus*, sugerindo o ambiente natural como principal foco de infestação triatomínica nos municípios. As análises de FA revelaram uma grande mobilidade da espécie no ambiente domiciliar, destacando as aves (49%) e os cães (22%) como principais recursos utilizados. A investigação do ambiente natural levou ao encontro do primeiro foco silvestre de *P. megistus* em Bambuí, após 69 anos de pesquisas, demonstrando a baixa densidade da espécie no meio silvestre. Foram identificados os gambás (*Didelphis sp.*) e os cães domésticos como principais reservatórios de *T. cruzi* nos ambientes natural e artificial, respectivamente. Os dados mostram que as infestações domiciliares por *P. megistus*, embora reduzidas, se mantêm permanentes na última década avaliada, mesmo com poucos focos silvestres, como detectado em Bambuí. Ficou evidenciado também a ocorrência de um progressivo declínio das densidades triatomínico-tripanosômicas nas áreas estudadas, o que se deve provavelmente à fatores relacionados com a permanente vigilância epidemiológica, à redução da população rural, a melhoria das habitações rurais e redução das áreas naturais associada à expansão agropecuária.

ABSTRACT

The triatomine *Panstrongylus megistus* can be found throughout the country in a diverse number of habitats, both silvatic and artificial. This work aimed to study the dynamics of *P. megistus* in the *Trypanosoma cruzi* transmission cycles in areas of Cerrado and Atlantic Forest in Minas Gerais, Brazil. The municipalities studied were Bambuí (Cerrado) and Piracema (Atlantic Forest). Colects were conducted in natural and artificial environments, in order to identify the population dynamics, food sources and the natural ecotope used by *P. megistus*, and to characterize the interrelationship of *T. cruzi* transmission cycles from the reservoirs and vectors involved. The field surveys were conducted in sites with high presence of the triatomine and proximity to natural areas. From the data evaluated was observed the success of vector control activities reached at different times, in each municipality. A geometric morphometric analysis showed no difference between domestic and silvatic populations, suggesting the natural environment as the main focus of infestation triatomine rates in the municipalities. The food sources analysis revealed a highly mobility of the specie in the domiciliar environment highlighting the birds (49%) and dogs (22%) as the main resources used. The investigation of the natural environment led to the meeting of the first focus of silvatic *P. megistus* in Bambuí, after 69 years of research, demonstrating the low density of the specie in the silvatic environment. It was identified the opossums (*Didelphis sp.*) and dogs as the main reservoirs of *T. cruzi* in natural and artificial environments, respectively. The data shows that household infestation by *P. megistus*, although reduced, remain persistent in the last decade evaluated, even with a few silvatic foci, as detected in Bambuí. It also demonstrates the occurrence of a progressive decline of *T. cruzi*/Triatomine-density in the studied areas, which is probably due to factors related to the permanent epidemiological surveillance, reduction of rural population, the improvement of rural housing and reduction of natural areas associated with the expansion of agriculture and livestock.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma das mais importantes parasitoses existentes no continente americano, cujo agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Devido às iniciativas intergovernamentais para o controle da doença, dos 17 milhões de indivíduos infectados observados na década de 80, atualmente se encontram aproximadamente 8 milhões nas Américas. No Brasil, a doença acomete cerca de 3 milhões de pessoas e constitui um dos principais problemas médico-sociais, apresentando grande impacto sócio-econômico-cultural devido à sua fase crônica capaz de acarretar incapacidade, ocasionando aposentaria precoce do indivíduo. Segundo estimativas oficiais da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), 12.500 mortes foram devido à doença de Chagas no ano de 2006 (Dias 2008, Rassi Jr *et al.* 2010).

O mecanismo natural de transmissão da doença acontece através da via vetorial, ou seja, pelo contato do hospedeiro vertebrado com fezes e/ou urina do inseto vetor contaminadas com as formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*. Os vetores são insetos hematófagos da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Mais de 140 espécies de triatomíneos já foram descritas e todas são potencialmente transmissoras do parasito (Costa *et al.* 2006; Costa & Felix 2007; Galvão & Ângulo 2006; Galvão *et al.* 2003; Martínez *et al.* 2007; Sandoval *et al.* 2007).

Os vetores se infectam quando formas tripomastigotas sangüíneas são ingeridas durante o repasto no hospedeiro vertebrado infectado (Figura 1). Uma vez no intestino posterior do inseto, as formas tripomastigotas se transformam em formas epimastigotas, multiplicam-se por divisão binária e, posteriormente, sofrem alterações morfológicas e fisiológicas transformando-se em tripomastigotas metacíclicas. Estas últimas formas se encontram no reto do inseto e estão aptas para infectar um hospedeiro vertebrado, como por exemplo, o homem. Logo após (ou mesmo durante) o repasto sangüíneo, o parasito é eliminado junto com as fezes e urina do vetor, penetrando na pele pelo local da picada, ou em mucosas íntegras, infectando diversos tipos de células. No interior das células do hospedeiro, as formas tripomastigotas se transformam em amastigotas, rompem a membrana do vacúolo parasitóforo e caem no citoplasma, onde se inicia um processo de divisão binária

simples longitudinal. Após a multiplicação, as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas, rompem a membrana da célula e direcionam-se para a circulação sanguínea, podendo infectar novas células, serem destruídas pelo sistema imune ou ainda serem ingeridas por outro inseto vetor dando continuidade ao ciclo biológico do parasito (Brener & Chiari 1973, Dias 1933).

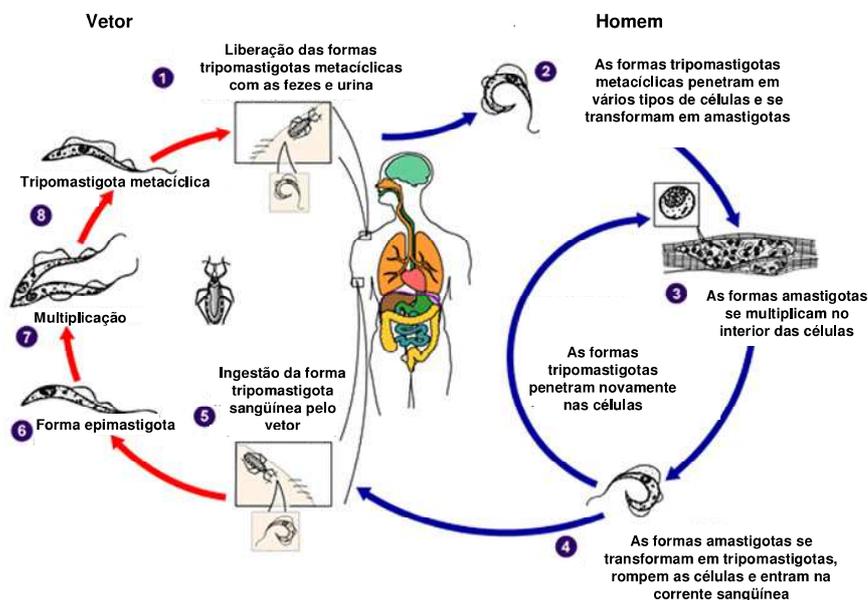


Figura 1 - Esquema do ciclo biológico do parasito *Trypanosoma cruzi*. As setas vermelhas indicam a multiplicação do protozoário no intestino do inseto vetor e as setas azuis, a multiplicação do protozoário dentro do hospedeiro humano (Fonte: CDC, 2011).

A análise de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes portadores da doença de Chagas permite classificar a infecção em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é o período inicial da moléstia e caracteriza-se pela relativa facilidade com que se evidencia o *T. cruzi* no sangue periférico. Manifestações sistêmicas como febre, mal estar, astenia, edema subcutâneo, linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, miocardite e meningoencefalite podem também ser observadas (Andrade 2000, Prata 1990; Rezende & Rassi 1994).

A evolução da fase aguda para a fase crônica é acompanhada pelo gradativo desaparecimento das manifestações clínicas e diminuição da parasitemia. Mais de 90% dos pacientes com manifestações clínicas da fase aguda sobrevivem à infecção inicial. Pouco a pouco, os parasitos tornam-se escassos no sangue periférico, a

sintomatologia se atenua e após algum tempo, em média 2 a 4 meses, a infecção entra em um período de latência clínica e torna-se crônica. Após permanecerem assintomáticos por vários anos, cerca de 30% dos pacientes chagásicos podem apresentar sintomatologias relacionadas com os sistemas cardiocirculatório (forma cardíaca), digestivo (forma digestiva) ou ambos (forma cardiodigestiva ou mista). Isto devido ao fato de mudar a anatomia e fisiologia do miocárdio e do tubo digestivo (esôfago e cólon, principalmente) (Andrade 2000).

Além da via vetorial, o *T. cruzi* pode ser transmitido através da via oral, congênita, transfusional, transplantes de órgãos e/ou acidentes laboratoriais. Atualmente, a via oral têm apresentado grande importância epidemiológica para a transmissão do *T. cruzi* no Brasil. Esta via, de caráter habitual no ciclo enzoótico primitivo, ocorre de maneira esporádica e circunstancial no ambiente utilizado pelo homem. Desde o relato de Mazza *et al.* (1936), sobre transmissão por leite materno, outros trabalhos têm relatado casos da transmissão via oral, como no distrito de Teutônia/RS (Silva *et al.* 1968), na região Amazônica (Aguilar *et al.* 2007, Coura *et al.* 2002) e em Santa Catarina (Steindel *et al.* 2008).

Na América do Sul, o crescente número de indivíduos infectados observado na década de 80 (Dias *et al.* 2002) levaram ao surgimento da “*Iniciativa Intergubernamental del Cono Sur*” (INCOSUR) em 1991. Formado por seis países Latino-Americanos (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), o INCOSUR teve como propósito elaborar um plano de ação para a eliminação do principal vetor da doença de Chagas, *Triatoma infestans* (Klug, 1834), além de interromper a transmissão pela via transfusional (Silveira 2002).

A história do controle vetorial no Brasil tem início na década de 40, com os primeiros ensaios contra *T. infestans* no município de Bambuí/MG, realizados pelo Dr. Emmanuel Dias (Dias 1945). Nesta época, este trabalho já chamava atenção para as medidas de profilaxia que visavam, além do combate ao barbeiro, melhorias habitacionais e educação sanitária. No início da década de 50, foi institucionalizado o Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCH) pelo Serviço Nacional de Malária (SNM), posteriormente continuado pelo Departamento Nacional de Endemias Rurais (DENERu). A partir de 1975, o PCDCH alcança abrangência nacional, sendo

sistemizado, estruturado e guiado pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), atual Fundação Nacional da Saúde (FUNASA) (Dias 1982).

Devido ao trabalho de profilaxia realizado ao longo dos anos, o Brasil foi declarado, pela OPAS em 2006, formalmente livre de transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans* e pela via transfusional (Dias 2006). Em decorrência do virtual desaparecimento deste vetor e das mudanças sócio-ambientais dos últimos anos, houve necessidade de uma revisão das estratégias e metodologia da vigilância epidemiológica (VE) no País. Atualmente, o risco de transmissão depende, entre outros fatores, da persistência de focos residuais de *T. infestans* e da ocorrência de triatomíneos silvestres ocupando o ambiente domiciliar (Ministério da Saúde 2005).

Ao longo do processo de controle de *T. infestans*, diferentes espécies silvestres de triatomíneos assumiram importância na transmissão doméstica do *T. cruzi* ao homem. Atualmente, um quadro epidemiológico mais diversificado se apresenta no Brasil, ao contrário da predominância demonstrada por *T. infestans* no século passado. Desta maneira, diferentes espécies de triatomíneos podem ser encontradas ocupando o ambiente doméstico, como *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), espécie autóctone do Rio Grande do Sul, onde tem sido encontrado tanto no ambiente peridomiciliar (em muros de pedras), como intradomiciliar (Almeida *et al.* 2000, Martins *et al.* 2006). No Espírito Santo, embora não ocorra freqüente domiciliação de barbeiros, *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859), tem demonstrado consideráveis índices de infecção natural por *T. cruzi* tornando-se um risco potencial para a transmissão da doença de Chagas no Estado (Santos *et al.* 2005).

O barbeiro *Triatoma sordida* (Stal, 1859), presente em 13 Estados brasileiros (Bahia, Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) está associado ao bioma Cerrado. Comumente são encontradas colônias peridomiciliares da espécie em galinheiros. Embora apresente baixos índices de infecção, o estabelecimento de grandes populações no ambiente artificial tem alertado sobre sua importância epidemiológica no risco de transmissão do parasito ao homem (Pires *et al.* 1999). A espécie *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911)

apresenta seu hábitat natural nas zonas semiáridas e de clima quente, sob o domínio da Caatinga (Forattini 1980). Encontra-se distribuído em 10 Estados brasileiros (Alagoas, Minas Gerais, Bahia, Ceará, Goiás, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe) (Carcavallo *et al.* 1999). Esta espécie pode habitar diferentes ecótopos domésticos e peridomésticos, sendo também encontrada largamente em ecótopos naturais (frestas entre pedras). Atualmente é considerada a principal espécie do nordeste brasileiro (Alencar 1987, Diotaiuti 2008).

A espécie *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), embora apresente uma ampla distribuição no território brasileiro (encontrada em 20 Estados do País) (Carcavallo *et al.* 1999), demonstra maior importância epidemiológica nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Alagoas e Pernambuco, onde é considerada a principal espécie autóctone transmissora do *T. cruzi* (Diotaiuti 2008). No ambiente natural, este triatomíneo se encontra associado à diferentes animais silvestres, tais como roedores e, principalmente, gambás (*Didelphis* sp.) colaborando assim com a manutenção do ciclo natural do *T. cruzi* (Carcavallo *et al.* 1999). A destruição do ambiente natural, associado à expansão desorganizada da área urbana têm aproximado este triatomíneo do ambiente domiciliar, possibilitando a inclusão do homem e animais domésticos no ciclo de transmissão do *T. cruzi* (Santos-Jr 2007).

Um estudo sistematizado enfocando a dinâmica de *P. megistus* em duas áreas que diferem quanto ao tipo de bioma e conservação ambiental, associado ao estudo da transmissão de *T. cruzi* entre vetores e reservatórios (domésticos e silvestres), pode trazer novos conhecimentos sobre as interações dos ciclos de transmissão do parasito, implicando nas questões relacionadas ao controle desta espécie, considerada importante vetor do parasito em largas extensões do Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a dinâmica do *Panstrongylus megistus* nos ciclos silvestre e domiciliar de *Trypanosoma cruzi* em áreas de Cerrado e Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

I - Caracterizar a infestação domiciliar e a dispersão de *P. megistus* nas áreas de estudo a partir dos dados do Programa de Controle da Doença de Chagas ao longo dos anos;

II - Analisar a dinâmica populacional de *P. megistus* nas áreas de Cerrado e Mata Atlântica através da técnica de morfometria geométrica;

III - Avaliar a presença de ecótopos naturais de *P. megistus* em locais de maior domiciliação da espécie;

IV - Identificar as diferentes fontes alimentares utilizadas por *P. megistus* nos municípios estudados;

V - Determinar a interrelação entre os ambientes domiciliar e silvestre a partir da infecção por *T. cruzi* de reservatórios (domésticos e silvestres) e vetores nos municípios de Bambuí e Piracema.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Entre as espécies de triatomíneos do Brasil, *P. megistus* destaca-se por apresentar uma elevada capacidade de adaptação ao ambiente doméstico e por sua ampla distribuição ao longo do País (Figura 2). Considerando fatores de diversidade genética e paleobiogeográficos, diferentes autores têm considerado como possíveis áreas de endemismo da espécie os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro (Barbosa *et al.* 2003, Forattini 1980, Forattini *et al.* 1978). Estes locais foram, desde o início da colonização do Brasil, continuamente atingidos pela devastação ambiental. Deste modo, sendo *P. megistus* uma espécie de clima úmido, a colonização do ambiente domiciliar tornou-se uma alternativa de sobrevivência à aridez provocada pela degradação do meio, propiciando sua dispersão por diversas áreas do País.

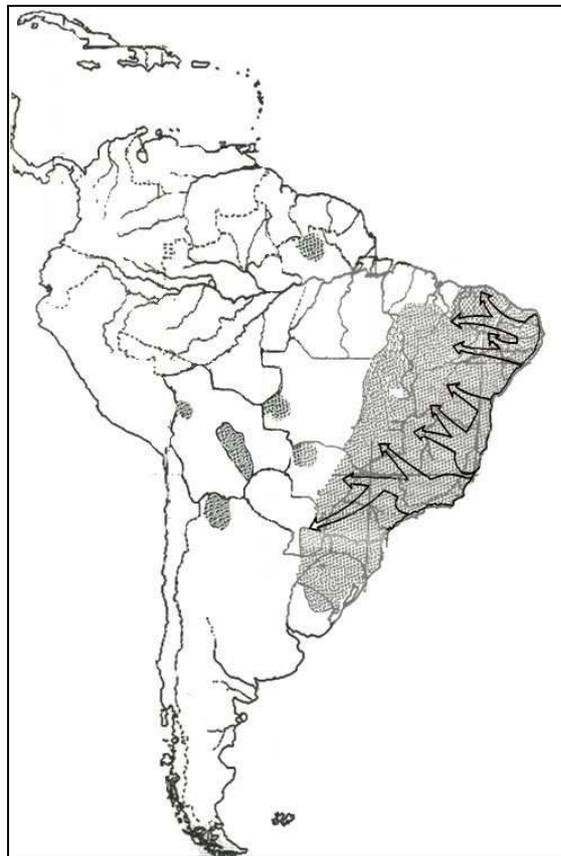


Figura 2 – Distribuição de *Panstrongylus megistus* no Brasil (Área rachurada). As setas indicam os centros de endemismo e a dispersão na América Latina propostos para a espécie (Adaptado de Carcavallo *et al.* 1999 e Forattini 1980).

Em áreas sujeitas às frentes polares, onde o clima apresenta duas estações bem marcadas, verão chuvoso e inverno seco, a infestação do ambiente artificial se apresenta de forma mais intensa. Regiões com maior destruição da cobertura vegetal, com inverno seco ou chuvoso, mostram maior tendência invasiva de *P. megistus* aos ecótopos artificiais do que áreas de clima mais úmido e de maior conservação ambiental (Forattini 1980, Forattini *et al.* 1978).

A presença deste triatomíneo no ambiente natural contribui na manutenção do ciclo silvestre da tripanossomíase americana, principalmente quando associado à pequenos mamíferos, como os marsupiais do gênero *Didelphis* (gambás). Diferentes estudos abordando as relações ecológicas de vetores e parasitos, buscaram identificar os diferentes locais utilizados por triatomíneos no ambiente natural. Schlemper-Jr *et al.* (1985) obtiveram um índice de 84,5% de infecção por *T. cruzi* em triatomíneos que coabitavam com gambás e roedores, em ocos de árvores e touceiras de gravatás, no Estado de Santa Catarina. Santos Jr (2007) obteve um índice de 73% de infecção em ninfas do barbeiro capturadas em ocos de árvores utilizados pelo gambá *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) na região metropolitana de Porto Alegre - RS. No Estado de São Paulo, Barretto *et al.* (1964), encontraram 324 ninfas e 69 adultos de *P. megistus* em ocos de árvores, touceira de piteira e fendas entre raízes da figueira *Ficus euomphala* onde haviam ninhos de gambás e roedores.

No ambiente natural, os gambás são considerados os principais reservatórios naturais do *T. cruzi* devido à sua alta infecção, grande susceptibilidade ao parasito e por freqüentarem tanto o ambiente natural, como domiciliar (Grisard *et al.* 2000, Moreno & Carcavallo 1999). Estes marsupiais, diferentes de outros mamíferos, apresentam indícios de uma relação evolutiva mais antiga com o protozoário, evidenciada pela ausência de danos ocasionados pelo parasito (Jansen *et al.* 1999, Schweigmann *et al.* 1995). Outro fator que lhes conferem importante referência epidemiológica são os consideráveis índices de infecção por *T. cruzi* já relatados na literatura, como os encontrados nos trabalhos de Rodrigues & Melo (1942) em Belém/PA (91,7%), Santos Jr (2007) em Porto Alegre/RS (69%), Toledo *et al.* (1997) na região nordeste do Paraná (57,1%), Fernandes *et al.* (1991) em Bambuí/MG (37,9%), Schweigmann *et al.* (1999) na Província de Santiago Del Estero - Argentina

(35%) e Mello (1982) em Mambai/GO (20,6%). Alguns autores consideram que parte da prevalência por *T. cruzi* encontrada nos gambás se deve ao seu hábito onívoro, que inclui insetos, já se encontrando partes de triatomíneos no conteúdo estomacal destes indivíduos (Crespo 1982).

Schweigmann *et al.* (1995), oferecendo barbeiros infectados em experimento controlado, indicaram a via oral como importante meio de infecção entre os gambás. Ribeiro *et al.* (1987) demonstraram um índice de infecção maior em gambás alimentados com triatomíneos (83%) do que com camundongos (60%) infectados. Camandaroba *et al.* (2002) realizaram experimentos de infecção via oral em camundongos suíços inoculando diferentes cepas ocorrentes nos ciclos silvestres e domiciliar, encontrando maior infectividade na cepa colombiana, biodema Tipo III e zimodema Z1 (atualmente TCI, Zingales *et al.* 2009) relacionada ao ambiente silvestre.

Estudos realizados por Deane *et al.* (1984) demonstraram que *T. cruzi* pode se multiplicar na forma epimastigota e se diferenciar para tripomastigota metacíclico na luz das glândulas paraclorais de gambás, o que torna estes indivíduos além de reservatórios, vetores potenciais da doença. Fernandes *et al.* (1989) estudaram o conteúdo destas glândulas de 20 gambás da espécie *D. albiventris* parasitados por *T. cruzi* no município de Bambuí/MG, encontrando um indivíduo positivo em diferentes amostras coletadas ao longo de 18 meses.

A classificação deste grupo de marsupiais foi apresentada por Gardner (1973), onde agrupou as espécies neotropicais em três ordens: Didelphimorphia, Microbiotheria e Paucituberculata, cada uma representada por uma família. A família Didelphidae (Didelphimorphia) apresenta a maior riqueza de indivíduos, com 65 espécies pertencentes a 17 gêneros (Costa & Patton 2006). O gênero tipo desta família, *Didelphis*, compreende quatro espécies: *Didelphis virginiana* (Kerr, 1792), *Didelphis marsupialis* (Linnaeus, 1758), *D. albiventris* (Lund, 1840) e *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826), sendo as três últimas encontradas no Brasil. Existem ainda relatos de duas outras espécies, *D. imperfecta* e *D. pernigra*, originadas de subdivisões de *D. albiventris* (Gardner 2005, Lemos & Cerqueira 2002, Ventura *et al.* 2002). A espécie *D. albiventris* pode ser encontrada nas regiões leste e centro-oeste

do País, na região norte e central da Argentina, no Uruguai, Paraguai, alcançando o sul da Bolívia (Lemos & Cerqueira 2002), com citações na Colômbia, Equador, Peru e Guiana Francesa (Streilein 1982). A espécie *D. aurita* distribui-se na porção leste do Brasil, do Estado de Alagoas à Santa Catarina, estendendo-se até o Mato Grosso do Sul, sudeste do Paraguai e a província de Misiones, na Argentina (Cerqueira & Lemos 2000). Em Minas Gerais podem ser encontradas as espécies *D. aurita* e *D. albiventris*, ocorrendo em simpatria em regiões limítrofes entre os biomas Cerrado e Mata Atlântica (Varejão & Valle 1982). A simpatria em *Didelphis* deve ser estudada no intuito de avaliar os distintos processos biológicos de exploração dos recursos, dado serem táxons semelhantes e evolutivamente muito próximos (Catzeflis *et al.* 1997).

Segundo Moreno & Carcavallo (1999) o reconhecimento dos diferentes habitats do barbeiro no ambiente natural e seus hospedeiros, possibilita construir uma teia trófica teórica levando a uma maior compreensão sobre os possíveis agentes envolvidos na manutenção e veiculação de *T. cruzi*. Embora a preocupação com os vetores secundários da doença de Chagas seja crescente, muitas características do seu comportamento silvestre permanecem pouco conhecidas. Este fato deve-se à grande dificuldade do estudo no ambiente natural, principalmente através de técnicas convencionais (como coleta direta e dissecação), que podem tornar-se extensivamente laboriosas e destrutivas ao meio ambiente (Gaunt & Miles 2000, Noireau *et al.* 2002). Uma técnica utilizada para otimizar a procura de triatomíneos silvestres é a do carretel de rastreamento. Miles (1976) foi o precursor do uso desta técnica em mamíferos, obtendo sucesso na procura de vetores de *T. cruzi* em ninhos de seus hospedeiros silvestres na Reserva Utinga (Belém/Pará) e na floresta do Horto (Rio de Janeiro – RJ), onde foram encontrados ninhos de *D. marsupialis* em oco de árvore contendo 12 ninfas de *P. megistus* infectadas pelo *T. cruzi* (Miles *et al.* 1982).

Embora a participação de roedores seja importante na manutenção e transmissão do *T. cruzi*, poucos registros são reportados sobre a infecção desse grupo. Devido à maioria dos levantamentos epidemiológicos estarem baseados na transmissão domiciliar, grande parte dos registros são vinculados à espécies como *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758), *R. norvegicus* (Linnaeus, 1758) e *Mus musculus* (Linnaeus, 1758). Existem relatos de infecção destes reservatórios por *T. cruzi*

desde o Texas (EUA) até o sul do Brasil (Packchianian 1942, Beltran e Peres 1949, Correa et al. 1963, Barretto et al. 1967). Dados mais freqüentes são encontrados sobre *R. rattus* com índices de infecção entre 4,3% e 30% (Herrera & Urdaneta-Morales 1997, Lainson et al. 1979, Tonn et al. 1982). A participação de roedores no ciclo natural do *T. cruzi* ocorre, muitas vezes, devido à presença de triatomíneos em seus ninhos. Miles et al. (1981) demonstram que *Echimys chrysurus* (Zimmermann, 1780) e *D. marsupialis* utilizam os mesmos tipos de refúgios na floresta tropical, podendo também abrigar barbeiros. A presença de espécies silvestres infectadas por *T. cruzi* tende a ser maior em ambientes fragmentados, do que nos mais conservados (Vaz et al. 2007).

A presença de vetores e hospedeiros silvestres infectados no ambiente domiciliar possibilita a inclusão do homem e animais domésticos no ciclo natural do *T. cruzi* (Forattini 1980). Entre os animais domésticos, os cães apresentam grande destaque como reservatórios tanto no Brasil como em outros países da América Latina e algumas áreas dos Estados Unidos. Estes animais, assim como os gambás, apresentam parasitemia persistente para *T. cruzi* (Gürtler et al. 1986, Zéledon et al. 1970). Os cães também podem desenvolver a fase crônica da doença apresentando sinais clínicos semelhantes aos dos humanos (Barr et al. 1989, Barr et al. 1991, Meurs et al. 1998).

Fernandes et al. (1994b) no município de Bambuí/MG, através de caracterização isoenzimática, indicam o cão como reservatório do zimodema Z1 (Atualmente TCI, Zingales et al. 2009), o mesmo caracterizado em *D. albiventris* capturados na região. Neste trabalho os autores ainda citam a participação de um gato como reservatório do zimodema Z2 (Atualmente TCII, Zingales et al. 2009) e ambos zimodemas em *P. megistus* capturados nas residências. Gürtler et al. (1992) realizando estudos em zonas rurais de Trinidad e Mercedes, noroeste da Argentina, encontraram um percentual de infecção por *T. cruzi* considerável em cães (41%) e gatos (39%), demonstrando uma relação significativa da presença destes animais com a infecção de *T. infestans*. As taxas de infecção de barbeiros foi significativamente maior quando os cães compartilhavam a mesma área de dormir dos moradores. Diferentes vias podem ocorrer para a infecção dos cães domésticos, principalmente a oral, através da caça à animais silvestres (Schweigmann et al. 1999).

Gürtler *et al.* (1991) avaliaram a sororreatividade de *T. cruzi* em cães e crianças de uma comunidade rural na região nordeste da Argentina, antes e depois do controle químico, em moradias infestadas com *T. infestans*. O autores observaram que a redução da prevalência dos triatomíneos (63% para 21%), foi proporcional à redução do índice de infecção tanto em crianças (48% para 30%), como em cães (83% para 40%). Entretanto, o percentual de barbeiros positivos foi 4,5 vezes maior onde haviam cães infectados, independente da presença ou ausência de crianças infectadas.

Diferentes testes sorológicos têm sido aplicados no diagnóstico dos animais domésticos como forma de otimizar os programas de controle epidemiológico. Lauricella *et al.* (1998) compararam a eficiência de três técnicas diferentes: teste de hemaglutinação indireta (HAI), Imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA), na avaliação de infecção de cães em Santiago Del Estero - Argentina. Entre as amostras analisadas, 86% foram positivas em todos os testes realizados. Trabalhos realizados no México por Estrada-Franco *et al.* (2006) corroboram com a relação direta entre cães e moradores infectados demonstrando o uso destes animais como sentinelas para os programas de saúde como proposto por Castañera *et al.* (1998).

Além do reconhecimento dos índices de infecção nos hospedeiros associados aos triatomíneos, a determinação das linhagens de *T. cruzi* presentes em cada ambiente é necessário para melhor compreender as relações entre os ciclos de transmissão do vetor. As populações de *T. cruzi* apresentam característica heterogênea, composta por um pool de cepas que circulam nos ecótopos silvestre e doméstico através de vetores, seres humanos e outros hospedeiros vertebrados. O isolamento e o estudo de populações do parasito de diferentes origens demonstraram um grande número de cepas com características biológicas, imunológicas, bioquímicas e farmacológicas distintas (Andrade 1985, Tibayrenc & Ayala 1988, Steindel *et al.* 1993). Miles *et al.* (1977), estudando o perfil de isoenzimas de amostras de *T. cruzi* do município São Felipe (BA), caracterizaram pela primeira vez duas formas do parasito, denominados zimodema Z1 e zimodema Z2. O primeiro grupo, zimodema Z1, foi isolado de gambás e do vetor *Triatoma tibiamaculata* (Pinto, 1926) procedentes do ambiente silvestre; o segundo grupo,

zimodema Z2, foi encontrado em pacientes chagásicos e animais domiciliados em casas infestadas pelo vetor doméstico *P. megistus*. A distinção das duas populações circulando independentemente sugeriu que os ciclos de transmissão silvestre e doméstico do *T. cruzi* em São Felipe/BA não se sobreponham. Posteriormente, Miles et al. (1978), analisando pacientes chagásicos de Belém (PA/Brasil), caracterizaram um terceiro grupo de parasitos, denominado zimodema Z3. Foi verificada, então, pela primeira vez, por meio dos estudos isoenzimáticos, a heterogeneidade de *T. cruzi* infectando o homem.

Romanha (1982), com o objetivo de caracterizar cepas do *T. cruzi* por métodos bioquímicos, estudou 67 amostras isoladas de pacientes chagásicos crônicos e de um reservatório silvestre (*D. albiventris*) do município de Bambuí (MG). Por meio do perfil eletroforético de isoenzimas, foram descritas quatro populações denominadas zimodemas A, B, C e D. As correlações entre os três zimodemas descritos por Miles et al. (1977, 1978) com os de Romanha foram: a) Z1 semelhante aos perfis de *T. cruzi* isolado do gambá; b) Z2 = ZA; e c) Z3 ~ ZC. Não foram encontradas correlações entre os zimodemas B e D. Diferenças morfológicas nas formas sanguíneas do parasito já haviam sido descritas por Chagas (1909) no seu trabalho sobre a nova tripanossomíase humana e por Dias (1933) em sua tese de doutorado.

A ausência de uma nomenclatura comum para classificação da grande variedade de populações de *T. cruzi* levou à formulação de um consenso, onde foi convenicionado duas linhagens principais, *T. cruzi* I (Tc I) e *T. cruzi* II (Tc II). A linhagem Tc I incluiu cepas predominantemente de origem silvestre (Zimodema 1, Tipo III, linhagem 2, Grupo 1, Ribodema II/ III ou similares) e pode representar a forma original do parasito; A linhagem Tc II albergou parasitos de origem predominantemente domiciliar (Zimodema 2, Zimodema A, Tipo II, Linhagem 1, Grupo 2, Ribodema I ou similares) (Anonymous 1999).

Posteriormente, Brisse et al. (2000) através de análises isoenzimáticas e PCR-RAPD (*Polimerase Chain Reaction – Random Amplification of Polymorphic DNA*), propuseram a subdivisão de *T. cruzi* em seis DTUs (*Discret Taxonomic Units*), sendo elas: I, IIa, IIb, IIc, IId, IIe; onde DTU I correspondente à *T. cruzi* I e o DTU IIb à *T.*

cruzi II. As sublinhagens IIa, IIc-e incluíram as cepas híbridas e as pertencentes ao Zimodema 3. Freitas *et al.* (2006) propuseram uma terceira linhagem em *T. cruzi*, denominada *T. cruzi* III. Em 2009, a partir de um comitê de especialistas, foi proposto uma nova nomenclatura para *T. cruzi*, onde: *T. cruzi* I e II correspondem à Anonymous (1999), *T. cruzi* III (Z3/Z1 ASAT, Z3-A, DTU IIc e *T. cruzi* III), *T. cruzi* IV (Z3, Z3-B, DTU IIa), *T. cruzi* V (Boliviana Z2, rDNA 1/2, clone 39 e DTU IId) e *T. cruzi* VI (paraguaia Z2, Zimodema B, CL Brener e DTU IIe) (Zingales *et al.* 2009).

Em muitas áreas com presença de *T. cruzi*, pode existir sobreposição com outro tripanossomatídeo, *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920). Ao contrário do *T. cruzi*, este protozoário é transmitido através da picada de barbeiros infectados, não sendo considerado patogênico para os vertebrados. Nos vetores hospedeiros, este parasito pode lesar o intestino, os túbulos de Malpighi, cutícula, traquéia, glândulas salivares e sistema nervoso (Garcia *et al.* 1994, Schaub 1992, Watkins 1971). No Brasil, este parasito ocorre em diferentes Estados, já sendo isolado em humanos e em reservatórios e vetores silvestres na bacia Amazônica (Miles *et al.* 1983). Na região sul do País, Estado de Santa Catarina, este parasito foi isolado em roedores silvestres (Steindel *et al.* 1991). Ramirez *et al.* (2002) em trabalho realizado na região do Triângulo Mineiro, região endêmica da doença de Chagas, observaram uma alta prevalência de *T. rangeli* em *D. albiventris*, um dos principais reservatórios naturais do *T. cruzi*.

Além da caracterização das populações do *T. cruzi*, métodos aplicados para o reconhecimento de populações de barbeiros entre o ambiente natural e domiciliar tem colaborado para o entendimento da dispersão e infestação triatomínica nas unidades domiciliares. Entre estes métodos pode-se destacar a morfometria geométrica. Esta técnica baseia-se no estudo da variação da forma e sua covariação com outras variáveis (Bookstein 1991). A morfometria geométrica têm sido amplamente utilizada em estudos de triatomíneos, principalmente populacionais, mas também, tem mostrado bons resultados nas análises interespecíficas. Matias *et al.* (2001) identificaram um espécime de *Rhodnius robustus* (Larousse, 1927) na Bolívia comparando com outras espécies do gênero através de morfometria geométrica das asas. Patterson *et al.* (2001) verificaram alto grau de similaridade entre *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) e outras sete espécies de *Triatoma* do

Novo Mundo através do estudo do tamanho e forma da cabeça, sugerindo uma ancestralidade comum entre as espécies. Dujardin *et al.* (1998), compararam populações de *R. prolixus* (Larrouse, 1927) da Colômbia e Honduras, com dados morfométricos e de RAPD, o que os levou a sugerir uma recente introdução no ambiente domiciliar desta espécie na América Central.

Estudos sobre a dinâmica populacional de *P. megistus* foram realizados buscando entender os diferentes comportamentos observados nos Estados brasileiros. Nos Estados do sul do Brasil esta espécie ocorre, principalmente, em ecótopos silvestres. Ao contrário de Minas Gerais, Bahia e alguns Estados da região nordeste, nas quais ocupa ecótopos artificiais (Forattini 1980). Pessoa (1962) propõe a existência de duas subespécies ecológicas, uma silvestre e outra adaptada à ecótopos artificiais através de mutações e mecanismos seletivos. Aragão (1961), por outro lado, acredita na existência de uma população monotípica de *P. megistus*, onde a diferença de comportamento se deve à diferentes condições ambientais de cada região, sendo a aridez um elemento climático limitante na dispersão deste barbeiro no Brasil.

Barbosa *et al.* (1999), visando caracterizar as diferentes populações de *P. megistus* encontradas ao longo do Brasil, demonstraram diferentes perfis eletroforéticos da proteína salivar do barbeiro. Entretanto, os dados não foram consistentes para assegurar a existência de duas subespécies. O estudo de populações obtidas em três Estados brasileiros, Bahia (BA), Minas Gerais (MG) e Santa Catarina (SC), sugeriram um cline demográfico, onde os exemplares de SC apresentaram um ganho de peso menor, associado a um maior número de repastos sanguíneos e maior mortalidade (seleção K - forte), quando comparados aos indivíduos da BA, com maior ganho de peso (e tamanho), menor número de repastos e mortalidade (seleção K - fraca). Os indivíduos de MG apresentaram características intermediárias entre estas populações. Desta maneira, os autores sugerem que o processo de domiciliação de *P. megistus* pode levar ao aumento da seleção K, estando associada à maior eficiência na utilização dos recursos (Barbosa *et al.* 2001). Avaliando as características morfológicas e enzimáticas destas populações (descritas no parágrafo anterior), Barbosa *et al.* (2003) observaram a formação de dois grupos distintos, BA + MG e SC. Dada a maior variabilidade genética dos

indivíduos avaliados na Bahia e Minas Gerais, os autores propuseram a inclusão de MG como centro de endemismo de *P. megistus*, juntamente com as áreas anteriormente propostas (Forattini 1980).

Barbosa *et al.* (2006) avaliaram 20 populações brasileiras de diferentes Estados (Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina e São Paulo) considerando dados paleobiogeográficos e moleculares (PCR-RAPD). A partir das características genéticas os autores identificaram uma sensível diferenciação entre as populações, observando uma menor similaridade entre Ceará (remanescente de Mata Atlântica) e Santa Catarina (Mata Atlântica), e a formação de um grupo de seis Estados (Alagoas, Bahia, Goiás, Minas Gerais e São Paulo) entre estas áreas. O trabalho permitiu inferir que as populações de *P. megistus* já estariam formadas há 18.000 anos (período de expansão de áreas abertas e formação de refúgios ecológicos), desta maneira os diferentes eventos paleo-vegetais ocorrido podem ter atuado de maneira diferente sobre cada população.

Todos estes fatos e informações, somados à elevada dispersão de *P. megistus* no Brasil e, mesmo ainda, significativos níveis de infestação domiciliar, levaram à elaboração do presente trabalho, com vistas ao aprofundamento no conhecimento da eto-ecologia da espécie. Triatomíneo nativo e silvestre em vastas extensões Sul-americanas, *P. megistus* deverá seguir como permanente elemento de risco de transmissão da doença de Chagas humana em suas áreas de ocorrência. Isto justifica o presente e futuros trabalhos que possibilitem o aprimoramento da imprescindível VE desta espécie.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Áreas de estudo

Minas Gerais é um dos Estados brasileiros com maior dispersão de *P. megistus*, sendo este, o principal transmissor potencial da doença de Chagas, justifica-se a escolha deste Estado como sede do presente trabalho. Como critérios de escolha das áreas para o estudo foram considerados fatores relacionados com o bioma natural (Cerrado e Mata Atlântica), presença constatada do vetor e parasito e, principalmente, Programa de Controle da Doença de Chagas ativo e apoio da Secretaria Municipal de Saúde (SMS), sem os quais seriam impossível a realização do projeto.

As capturas de *P. megistus* foram realizadas nos municípios de Bambuí e Piracema, Minas Gerais/Brasil (Figura 3), regiões onde há registro de ocorrência destas espécies em diferentes épocas do ano, de acordo com a 3ª Gerência Regional da Saúde (3º GRS). O município de Bambuí situa-se próximo à Serra da Canastra, a uma latitude de 20°00'21" Sul, uma longitude de 45°58'37" Oeste e com uma altitude de 706 m. O município tem uma área total de 1.455,82 km², 22.709 habitantes (em 2010), dista 270 km da capital Mineira e se encontra inserido no contexto do bioma Cerrado. Atualmente está dividido em 203 localidades, a maioria rurais, baseando sua economia na produção de leite e no plantio do café, arroz, milho e soja. Mais recentemente a agricultura tem sido movimentada pela instalação de uma grande usina de álcool e açúcar, levando muitos agricultores à monocultura da cana-de-açúcar. Segundo dados do IBGE sobre o ano de 2010, da área total do município, 62% está relacionada aos estabelecimentos agropecuários, sendo 6% desta área utilizada como lavouras permanentes. Na pecuária, o município conta com 79.362 cabeças de bovinos, gerando uma produção de 41.616 litros de leite/ano. A área de pastagem abrange em torno de 44% do município (IBGE 2010). Em 1943, foram iniciadas as atividades do Posto Avançado de Estudos Emmanuel Dias (PAEED), vinculado à FIOCRUZ, o qual tinha como objetivos principais a profilaxia e o controle da doença de Chagas na região (Dias 1982).

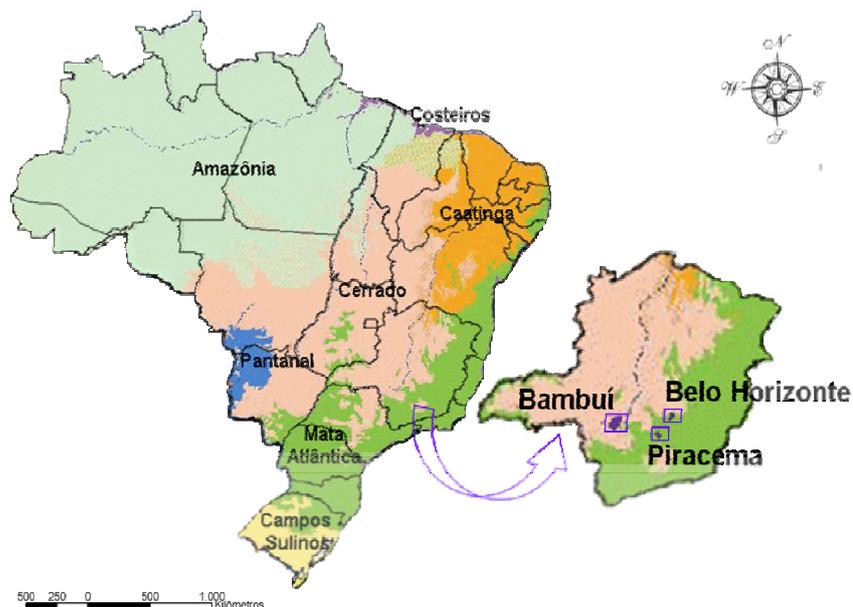


Figura 3 – Mapa de localização de Bambuí (20°00'21" Sul, 45°58'37" Oeste) e Piracema (20°30'28" Sul; 44°28'57" Oeste), demonstrando a localização dos municípios nos biomas Cerrado e Mata Atlântica, respectivamente (Adaptado de Ecossistemas brasileiros, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, s.d.)

O município de Piracema se localiza a uma latitude de 20°30'28" Sul e uma longitude de 44°28'57" Oeste, apresentando altitude de 872 m. Este município está inserido no bioma Mata Atlântica. Apresenta uma área total de 280 km², 6.406 habitantes e dista 120 km da capital mineira. Dividido em 59 localidades, a maioria também de características rurais, as atividades agropecuárias são baseadas no plantio de lavouras e na criação de gado para o comércio leiteiro. De acordo com dados do IBGE, da área total do município, 40% está relacionada aos estabelecimentos agropecuários, sendo 4% desta área utilizada como lavouras permanentes. Na pecuária, o município conta com 18.034 cabeças de bovinos, gerando uma produção de 16.000 litros de leite. A área de pastagem abrange em torno de 28% do município (IBGE 2010).

4.2 Procedimentos Gerais

4.2.1 Coleta de dados do Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCH)

Em cada município foi realizado um levantamento dos dados obtidos pelo PCDCH entre a década de 70 e o período atual. Os dados do município de Bambuí foram obtidos de três períodos: 1974/75, 1977/78 e 1979/80, disponibilizados pelo PAEED. A partir dos dados armazenados no Cardex (banco de dados – PCDCH/SUCAM/FUNASA), foram obtidos dados relativos às pesquisas integrais (PI) do município realizadas em 1983 e 1990. Dados atuais (2004 a 2010) sobre a ocorrência e distribuição de *P. megistus* foram adquiridos no PCDCH coordenado pela 3ª GRS – Divinópolis/MG. O município de Piracema, como as demais cidades de Minas Gerais, teve o controle da doença de Chagas coordenado pela SUCAM entre 1976 e 1993. Os dados sobre as infestações deste município foram obtidas através dos dados do Cardex.

Para avaliação do período atual, VE, do PCDCH, foi firmada uma parceria entre o Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas (LATEC-CPqRR/FIOCRUZ-MG), a 3ª GRS – Divinópolis e as Secretarias Municipais de Saúde de Bambuí e Piracema. Neste acordo, realizado em 2008, ficou combinado que os triatomíneos recebidos pelos PCDCH municipais seriam encaminhados ao LATEC, o qual procederia com a identificação do barbeiro e análise de infecção por *T. cruzi*. Este caminho permitiu um recebimento mais íntegro dos insetos capturados e uma resposta mais rápida aos municípios, os quais realizaram com as atividades de vistoria e expurgo das residências notificadas. Para melhor observação das infestações triatomínicas da última década, foram avaliadas as notificações e os atendimentos realizados no período entre 2004 e 2010. A partir destes dados, foi possível determinar a infestação domiciliar e a dispersão de *P. megistus* nos municípios, caracterizar as notificações e atendimentos realizados (intradomicílio e peridomicílio) e verificar a variação sazonal de ninfas e adultos, bem como os índices de infecção por *T. cruzi*.

4.2.2 Investigação do ambiente domiciliar e silvestre

Foram realizadas amostragens de campo entre março/2008 e maio/2010, a partir de residências próximas à áreas naturais com maior presença de *P. megistus*. Características como segurança (evitando depredação das armadilhas) e acessibilidade, também foram consideradas na escolha das áreas. A partir das unidades domiciliares selecionadas, foram realizadas buscas por triatomíneos no ambiente domiciliar e nas áreas naturais próximas. Para uma avaliação dos ciclos de transmissão do *T. cruzi*, foram realizadas amostragens de animais domésticos (cães e gatos) e animais sinantrópicos e silvestres (roedores e gambás). Todas as moradias foram georreferenciadas (GPS CSX76 - Garmin®) possibilitando a avaliação da proximidade das casas notificadas de diferentes classes de vegetação em cada município analisado. Para esta análise foi utilizada uma imagem da vegetação Landsat 5 (Instituto Estadual de Florestas – IEF/MG) referente ao ano de 2003, com cinco diferentes classes de vegetações: Campo, Cerrado Típico, Cerrado Denso, Floresta Semidecídua e Eucalipto. Através do programa ArcGis 9.3 foram realizadas análises de distância (*buffers*) a cada 20m, até uma distância total de 200m, entre as casas e as classes vegetais mais próximas.

Além do recebimento dos triatomíneos obtidos pelo PCDCH ao longo do período amostrado, as residências selecionadas para a avaliação do ambiente natural foram sistematicamente investigadas para a presença de barbeiros. Tanto o intradomicílio, como o peridomicílio foram investigados ativamente com auxílio de lanternas e pinças. No peridomicílio foram colocadas, em algumas oportunidades, armadilhas luminosas confeccionadas com duas lâmpadas de mercúrio 150 Watts e um pano branco para captura de barbeiros adultos.

4.2.2.1 Carretel de Rastreamento

Para o encontro de colônias naturais de *P. megistus*, foi realizada a investigação do ambiente natural, através de buscas ativas (procura por tocas na mata) e com auxílio do carretel de rastreamento. As buscas ativas foram realizadas em locais com potencial para abrigar colônias de barbeiros (occos e anfractuosidades de árvores, tocas no chão, ninhos de aves, etc.) em todo fragmento de vegetação próximo à casa, conforme modelo de Barretto (1979). Em casos de áreas naturais muito extensas foram realizadas buscas até 500 metros das moradias.

O carretel de rastreamento é uma técnica utilizada para indicar os locais de uso e abrigo de animais silvestres. O equipamento utilizado foi composto por linha de polipropileno com 914 metros de comprimento (7cm x 4 cm, 54 g). Os carretéis foram montados em potes plásticos, com um eixo central, formando o equipamento para rastreamento (Figura 4). Os equipamentos foram presos no dorso dos marsupiais capturados, na altura da cintura escapular, com atadura e fita crepe, não restringindo os movimentos do animal. Após estes procedimentos a linha foi presa na armadilha e os animais soltos no mesmo ponto de captura. O percurso deixado pela linha foi seguido na manhã seguinte. As tocas encontradas foram investigadas para buscas de triatomíneos ou de seus vestígios (ovos, exúvias, partes do corpo, etc.). As tocas que foram apenas exploradas pelo animal, ou seja, locais que os gambás visitaram e logo em seguida continuaram o percurso, foram classificadas como “tocas visitadas”. Os locais que foram encontrados no final do percurso, indicado pela presença do gambá com o carretel aderido, foram classificados como “ninho”. Para avaliação da temperatura e umidade relativa no interior das tocas com presença de barbeiros e do ambiente externo, foi utilizado o equipamento HOBO[®] H8 data logger, ONSET Computer Corporation (HOBO[®] sensor), programado para leituras a cada 15 min. Os dados foram tratados no programa BoxCar[®] Pro 4.3.

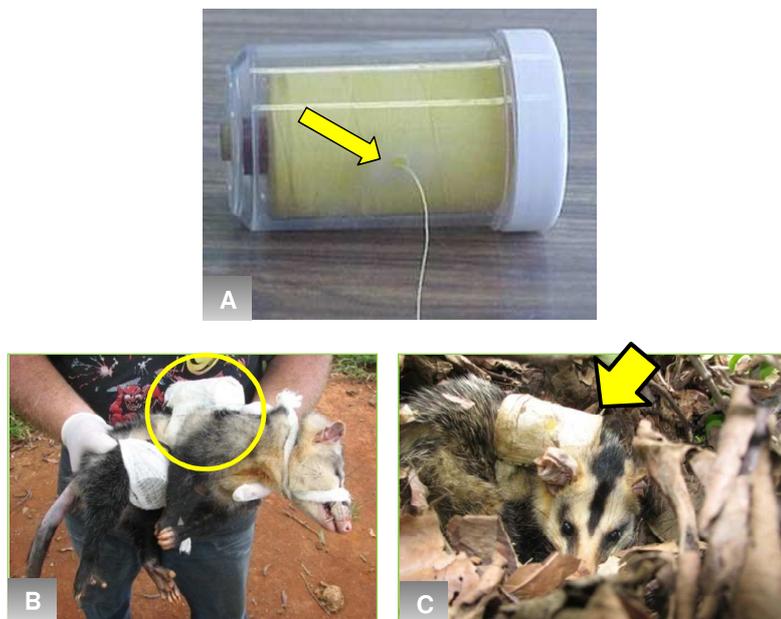


Figura 4 - Carretel de rastreamento utilizado na procura das tocas de gambás no meio silvestre (7 x 4 cm, 54 g). **A** - Carretel utilizado (seta indicando o orifício de saída da linha); **B** - *Didelphis albiventris* com carretel instalado; **C** - Gambá encontrado no ninho (seta indicando o carretel).

4.2.2.2 Armadilhas de Noireau

Tanto as tocas encontradas por busca ativa, como por carretel de rastreamento, foram investigadas com auxílio de lanternas e pinças, armadilhas adesivas com isca viva (armadilhas de Noireau) (Noireau *et al.* 2002) e coleta do material do seu interior para triagem. As armadilhas de Noireau utilizadas seguiram dois modelos: **A** - o primeiro consistiu em potes plásticos, fechados com telas, possuindo um camundongo como isca, envolvidos com fita-dupla face (Figura 5A) e **B** - adaptação para o uso de galinhas como isca, a partir de armadilhas de arame, envolvidas com a mesma fita (Figura 5B). A armadilha com camundongos foi utilizada em ocos de árvores, frestas entre pedras e locais de mais difícil acesso. As armadilhas com galinhas foram utilizadas, principalmente, em palmeiras e em um oco de árvore (Figura 5C). Foi colocado nas armadilhas um ninho artificial (papel e palha) e alimento para melhor acomodação dos animais utilizados. As armadilhas foram instaladas no final da tarde e recolhidas na manhã seguinte.



Figura 5 – Armadilhas de Noireau utilizadas na captura de triatomíneos. **A** – Armadilhas com camundongos colocados em frestas entre pedras. **B** e **C** - Adaptação com galinhas: colocadas em palmeiras e instaladas num oco de árvore, respectivamente.

Todos os barbeiros enviados pelo PCDCH e encontrados durante as amostragens de campo tiveram as fezes analisadas para presença de *T. cruzi* (item 4.2.3.1). Também foi coletado o conteúdo estomacal para análise da fonte alimentar (item 4.2.3.4) e os espécimes utilizados nas análises populacionais de *P. megistus* (Item 4.2.3.5).

Em cada amostragem de campo foram instaladas armadilhas de arame, de diferentes tamanhos, nos ambientes peridomiciliar e silvestre para captura de marsupiais e roedores. As armadilhas foram iscadas com abacaxi, banana ou bacon. A isca foi colocada na parte final da tarde e as armadilhas revisadas na manhã seguinte. Os indivíduos capturados foram pesados (balança com precisão de 25g), anestesiados (ketamina+xilazina) e investigados quanto à infecção por *T. cruzi*. A presença do parasito foi detectada a partir de exames parasitológicos (item 4.3.2.1) e moleculares a partir do sangue total (item 4.2.3.2). A idade dos gambás foi estimada a partir da análise da erupção e desgaste dentário (Figura 6).

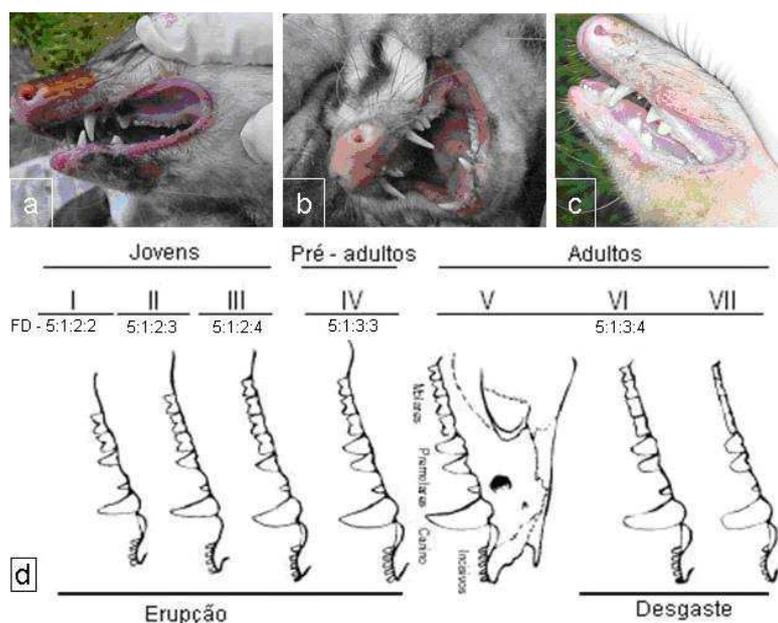


Figura 6 - Determinação da idade dos gambás segundo a erupção e desgaste dos dentes: **A** - Jovem classe III; **B** - Adulto classe V; **C** - Adulto classe VII; **D** - Classes de idades para *D. albiventris*: I – erupção de dois pré-molares e dois molares, o primeiro decíduo; II – agregação de um terceiro molar; III – agregação de um quarto molar; IV – o primeiro molar (decíduo) é substituído por um terceiro pré-molar; V – erupção do último molar; VI e VII – cúspides dos caninos, pré-molares e molares desgastados. FD = fórmula dentária. Adaptado de Schweigmann *et al.* (1999) e Tyndale-Biscoe & Mackenzie (1976).

Os filhotes encontrados no marsúpio das fêmeas tiveram a idade estimada de acordo com Schweigmann (1994) para *D. albiventris* e Motta (1988) para *D. aurita*. Foram realizadas nos gambás a instalação de carretel de rastreamento e coleta da secreção das glândulas anais. A coleta da secreção das glândulas anais, ou de

cheiro, foi realizada através de compressão e coleta do material em papéis filtro (J. Prolab 80 g nas medidas 5 x 10 cm) no mesmo local de captura. As amostras foram acondicionadas em local limpo para secagem, armazenadas em envelopes de papel alumínio e, posteriormente, conservadas a -70°C. Buscando identificar a infecção destas glândulas por *T. cruzi* foi realizada a análise molecular destas amostras (item 4.2.3.2).

4.2.2.3 Coleta de sangue em animais domésticos (cães e gatos)

A amostragem dos animais domésticos foi realizada a partir de visitas às residências com notificações de *P. megistus*, entre 2004 e 2010, e coleta de sangue de cães e gatos. A amostragem foi realizada com auxílio, esclarecimento e livre consentimento dos proprietários (Anexo 8.1). Nos cães, na maior parte dos casos, foi realizada a coleta do sangue total por punção venosa, com auxílio de seringas 5 mL, acondicionado em tubos *Vacutainer*[®] (tampa vermelha) para as análises sorológicas (item 4.2.3.3). Para a análise molecular pela técnica de PCR-Multiplex (item 4.2.3.2), foi separado 1 mL do sangue coletado e armazenado em Guanidina/EDTA, na proporção 1:1 (1 mL de sangue para 1 mL de Guanidina/EDTA). Quando não foi possível a coleta por punção venosa, foi realizada apenas a coleta em papel filtro através de punção da ponta da orelha. A perfuração foi realizada com auxílio de lanceta estéril, sendo as gotas de sangue coletadas em papel filtro (formando uma mancha de pelo menos 3 cm de diâmetro). Dado que em muitas residências os gatos são arredios, não permitindo seu manuseio, foram instaladas armadilhas no ambiente peridomiciliar. Desta maneira, grande parte da análise de infecção em gatos foi realizada através da PCR-Multiplex com amostras de sangue em papéis - filtro (item 4.2.3.2). Quando possível foram realizados exames parasitológicos (Item 4.2.3.1).

4.2.3 Análises realizadas nos reservatórios e vetores amostrados nos municípios de Bambuí e Piracema

4.2.3.1 Exames parasitológicos

Para detecção e isolamento de *T. cruzi* nos reservatórios foram utilizadas as técnicas de xenodiagnóstico e hemocultura. O teste de xenodiagnóstico foi aplicado, principalmente em marsupiais e roedores, no entanto, quando possível foram realizados também em cães e gatos. Nos cães foram usadas em média 30 ninfas de *R. neglectus* (Lent, 1954) (entre 2° e 4° instar) e nos gatos uma média de 10 a 20 ninfas. O teste realizado em marsupiais e roedores utilizou de 4 a 10 ninfas, dependendo do tamanho do animal, entre 3° e 4° instar de *R. neglectus* e/ou *T. infestans*, obtidos no insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da doença de Chagas (LATEC - CPqRR - FIOCRUZ/ MG). Após as primeiras amostragens, foi observado um menor aproveitamento no repasto sangüíneo realizado por *T. infestans* quando comparado com *R. neglectus*. Desta maneira, optou-se por utilizar a última espécie em todas as amostras. Os potes com barbeiros foram colocados durante 20-30 minutos sobre os animais analisados. Após as amostragens, estes potes foram mantidos em estufa (28 °C, UR 80%) até o momento da análise. Foi realizada uma alimentação no 23° dia após a exposição de acordo com Dias (1933) e Perlowagora-Szumlewicz & Müller (1982). A análise foi realizada no 45° dia após a exposição através da observação das fezes. Para a análise, parte do conteúdo do tubo digestivo foi colhido, por compressão e examinado com auxílio de microscópio óptico (400x). Todos os indivíduos também tiveram amostras da hemolinfa analisada (corte na pata mediana) no intuito de identificar co-infecção por *T. rangeli*. O conteúdo intestinal dos indivíduos infectados foram semeados em meio NNN/LIT (Novy, McNeal & Nicole/ *Liver Infusion Tryptose*), repicados semanalmente e criopreservados em nitrogênio líquido (- 196°C), integrando o banco de cepas do LATEC.

Após as primeiras amostragens de campo foi adicionado um segundo método de avaliação parasitológica, a hemocultura. Esta técnica foi realizada no mesmo ponto de captura dos animais, através da coleta de sangue por punção venosa e inoculação (0,5 mL) deste em tubos previamente preparados com meio LIT (4 mL).

As hemoculturas foram mantidas em estufas e analisadas a partir de 15 dias após a inoculação do sangue. As amostras positivas foram repicadas semanalmente e criopreservadas (-196°C).

Os triatomíneos capturados em campo ou enviados pelo PCDCH foram submetidos ao exame à fresco das fezes, como descrito para os barbeiros utilizados no xenodiagnóstico (item 4.2.3.1). O material dos indivíduos positivos também foi semeado em meio de cultura e criopreservado. Parte dos indivíduos coletados em campo foram dissecados para análise de fonte alimentar (item 4.2.3.4) e parte das ninfas negativas foram mantidas no insetário até atingirem o estágio adulto. Os insetos adultos foram utilizados para as análises de dinâmica populacional de *P. megistus* (item 4.2.3.5). Nos barbeiros infectados por *T. cruzi* com pouco conteúdo intestinal, a coleta das fezes foi realizada em papéis filtro (J. Prolab® 80g), para posterior caracterização molecular (item 4.2.3.2).

Para observar a concordância entre os resultados parasitológicos e PCR-Multiplex da infecção por *T. cruzi* nos reservatórios, foi realizada uma análise estatística do índice Kappa (Landis & Koch 1977), possibilitando observar a concordância entre os dados. Os resultados foram interpretados de acordo com a TABELA 1.

TABELA 1 – INTERPRETAÇÃO DO COEFICIENTE KAPPA

Valor do índice Kappa	Poder de concordância
< 0,00	Pobre
0,00 a 0,20	Pequeno
0,21 a 0,40	Regular
0,41 a 0,60	Moderado
0,61 a 0,80	Substancial
0,81 a 1,00	Quase perfeito

4.2.3.2 Caracterização molecular de tripanossomatídeos

A identificação e caracterização molecular da infecção por *T. cruzi* foi realizada em diferentes amostras coletadas de vetores e reservatórios. Para caracterização do parasito foi utilizada a técnica de PCR-Multiplex (Liarte *et al.* 2009), com modificações. Esta técnica permite a identificação de *T. cruzi* e a classificação do parasito nos dois principais grupos de *T. cruzi* I (fragmento de 111 pb) ou *T. cruzi* II (fragmentos 111 pb e 195 pb). No entanto não demonstra a presença de infecções mistas (*T. cruzi* I e II).

A análise foi realizada em dois tipos de amostras: papel filtro (sangue total de gambás, fezes de barbeiros, culturas de parasitos e secreção das glândulas anais dos marsupiais) e sangue total (Guanidina/EDTA). Para as amostras em papel filtro foram utilizados dois picotes redondos (6 mm de diâmetro) e nas amostras de sangue total, 50 µL. Para a avaliação da técnica de PCR-multiplex na caracterização da infecção canina, foram realizadas análises em amostras de dois cães infectados experimentalmente (disponibilizadas pelo Laboratório de doença de Chagas – UFOP/MG).

Para a extração do DNA as amostras foram acondicionadas em tubos eppendorf (1.5 mL) contendo 500 µL de água bi-distilada por 30 min. (temperatura ambiente). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm (5 min.) para remoção do sobrenadante e adição de 100 µL resina quelante *InstaGene Matrix* (BioRad®). A amostra foi incubada a 56°C (30 min.) e 100°C (8 min.), centrifugada e o sobrenadante armazenado a - 20°C. Para a amplificação do DNA satélite do parasito foram utilizados os iniciadores Diaz7 (5` CGC AA ACA GAT ATT GAC AGAG 3`), Diaz8 (5` TGT TC ACA CAC TGG ACA CC AA 3`) (Diaz *et al.* 1992) e TcSat4 (5` GCA GC CGC TCG AAA ACT AT CC 3`). Em cada experimento foi utilizado um volume total de 10 µL, contendo tampão de reação (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, -MgCl₂), 1.9 mM de MgCl₂, dNTP (200 µM de cada desoxirribonucleotídeos – Promega, Madison, WI, USA), 5 pmoles de cada iniciador, 0.5 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) e 1 µL de DNA, água q.s.p. 10 µL.

A amplificação foi realizada com o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient e envolveu uma desnaturação de 4:30s a 95°C, seguido de 28 ciclos de 30s a 95°C, 10s a 60°C e 15s a 72°C e uma extensão final de 6:45s a 72°C. Os produtos amplificados (3 µL) foram observados por eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) e corados com nitrato de prata. Como controles foram utilizadas as cepas Colombiana (*T. cruzi* I) e a cepa Y (*T. cruzi* II). Como padrão de peso molecular foi utilizado ΦX174 digerido com a enzima Hae III.

A detecção de *T. rangeli* foi realizada de acordo com Grisard *et al.* (1999), em amostras em papel filtro (com culturas do parasito, fezes e/ou hemolinfa) de *P. megistus* com exame parasitológico positivo para *T. cruzi*. Foram utilizados os iniciadores TrINT1 (5'-CGCCATTCGTT TGTCC-3'), TrINT 2 (5'-TCC AGC GCC ATC ACT GAT C-3') e TrINT 3 (5'-AAG ATG AGG CGT GGC TCT G-3'). A extração de DNA seguiu o mesmo método utilizado para amostras em papel-filtro para caracterização de *T. cruzi*. Em cada experimento foi utilizado um volume total de 10 µL, contendo tampão de reação (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, -MgCl₂), 1.9 mM de MgCl₂, dNTP (200 µM de cada desoxirribonucleotídeos – Promega, Madison, WI, USA), 2 pmoles de cada iniciador, 0.5 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA) e 1 µL de DNA, água q.s.p. 10 µL. A amplificação foi realizada com o termociclador Eppendorff[®] Mastercylcer Gradient. As condições da PCR foram: desnaturação inicial de 10 min. a 94°C, seguido de 7 ciclos de 30s a 94°C, 2s a 45°C e 2s a 72°C, após mais 26 ciclos de 30s a 94°C, 1 min. a 50°C e 30 min. a 72°C, seguidos de uma etapa de anelamento, 1 min. a 50°C, e extensão final, 5 min. a 72°C. Os produtos amplificados (3 µL) foram observados por eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) e corados com nitrato de prata. Como controle positivo foram utilizados papéis filtro impregnados com culturas de *T. rangeli* obtidas no laboratório. O padrão de peso molecular foi o mesmo utilizado para as análises de *T. cruzi*.

4.2.3.3 Análises sorológicas

Dada a possibilidade de reações cruzadas entre doença de Chagas e as leishmanioses, foram realizados testes sorológicos para investigação de ambas infecções nos soros caninos. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Parasitologia da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Minas Gerais, sob a supervisão da Bióloga Eliane Moreira Furtado. Nos cães onde foi possível somente a coleta de sangue em papel filtro (item 4.2.2.3), foi realizada apenas a análise de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para doença de Chagas e leishmaniose visceral canina. Para a análise dos soros caninos foram realizadas as técnicas diagnósticas abaixo descritas:

I - Testes sorológicos para avaliação da infecção por *T. cruzi* em cães:

A) Hemaglutinação indireta (HAI), Hemacruzi®- Biomeriaux:

Este teste baseia-se na aglutinação de hemácias de aves estabilizadas e sensibilizadas com antígenos totais de *T. cruzi* (antígenos solúveis) quando estas são colocadas em contato com diluições de soros de cães infectados. A análise foi realizada de acordo com as especificações do fabricante, utilizando uma diluição 1:20 (10 µL do soro-teste + 200 µL do R2A) das amostras. Após a aplicação das amostras, a microplaca permaneceu em repouso por 1 h à temperatura ambiente. A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte forma:

- Reação positiva: véu uniforme de hemácias recobrimdo toda a cavidade, podendo estar às vezes, parcialmente retraído nas bordas;
- Reação fracamente positiva: véu pouco nítido, apresentando pequeno depósito de hemácias no fundo da cavidade;
- Reação negativa: botão compacto de hemácias no fundo da cavidade.

B) Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IFI – Doença de Chagas[®], BioManguinhos):

Este teste consiste na reação de soros com parasitos (*T. cruzi*), fixados em lâminas de microscopia. Numa etapa seguinte, utiliza-se um conjugado fluorescente para evidenciação da reação. A análise foi realizada segundo orientações do fabricante. Previamente foi realizada a diluição dos soros-teste (1:40 e 1:80) e os controles positivos (1:40) e negativos (1:40) em PBS. Para leitura e interpretação das reações, utilizou-se o microscópio de imunofluorescência e objetiva de 40x. Os títulos $\geq 1:80$ foram considerados como reação positiva, segundo sugerido pelo kit.

C) *Trypanosoma Detect*[®] Rapid Test, INBIOS International:

O *Trypanosoma Detect*[®] é um teste imunocromatográfico rápido e tem sido utilizado para determinação qualitativa de anticorpos contra o antígeno recombinante multi-epitopo (*Multi-epitope Recombinant Antigens - MRA*) do *T. cruzi*. Este teste fundamenta-se na propriedade de um *mix* padrão contendo o conjugado padrão alvo e sua habilidade de ligar-se à anticorpos presentes no soro. O teste foi realizado segundo orientações do fabricante. Foram utilizados 20 μ L de soro canino na área-teste e a leitura realizada após 10 min. Um teste foi considerado positivo e válido quando foi possível observar a linha-teste e a linha-controle. Quando foi possível visualizar apenas a linha-controle, o teste foi considerado negativo.

II - Testes sorológicos para avaliação da infecção por *Leishmania* sp. em cães:**A) Ensaio imunoenzimático (EIE - Leishmaniose visceral canina[®], BioManguinhos)**

O teste imunoenzimático se baseia na reação de soros de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos à partir de cultura “in vitro”, que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas, em presença de soro contendo anticorpos contra esse antígeno e revelados por compostos enzimáticos e seus respectivos substratos para a pesquisa do imunocomplexo. A

reação final é mensurada por um espectrofotômetro que avalia a mudança de cor da solução do substrato. A amostra foi considerada reagente quando apresentava densidade ótica igual ou superior ao *cut-off* e não-reagente quando apresentava densidade ótica inferior ao *cut-off*. Em todos os testes foram incluídas amostras de soros controles positivo e negativo para Leishmaniose visceral canina.

B) Reação de imunofluorescência indireta (RIFI), (IFI – *Leishmaniose visceral canina*[®] BioManguinhos):

O procedimento desta técnica é semelhante ao descrito para o diagnóstico da doença de Chagas (item 4.2.3.3 – I, B), entretanto, na interpretação das amostras, títulos $\geq 1:40$ foram considerados como reação positiva, segundo sugerido pelo kit. Para este teste foram utilizados eluatos, de amostras em papel filtro, e soro de cães obtidos em diferentes localidades das áreas estudadas.

4.2.3.4 Análise da fonte alimentar

Parte dos triatomíneos coletados nos ambientes domiciliar e silvestre, tanto ninfas como adultos, foram investigados quanto às fontes alimentares utilizadas. Em laboratório, com auxílio de microscópio estereoscópico, pinças e lâminas, os insetos foram dissecados e o conteúdo do tubo digestivo misturado com 100 μ L de PBS (solução salina fosfatada 10 mM pH 7,2 – *Phosphate buffered saline*), macerado e posteriormente armazenados (- 20°C) até o momento da análise. A análise da fonte alimentar foi realizada pelo teste de ELISA seguindo o método de Burkot *et al.* (1981), modificado por Duarte (1997). Os anti-soros testados foram de cão, cavalo, galinha, gambá, gato, lagarto, ovelha, rato, tatu, vaca, além de soro humano. Esta etapa foi realizada em colaboração com a Dra. Rosemere Duarte (ENSP/Fiocruz, RJ).

4.2.3.5 Análise de morfometria geométrica

A análise da morfometria geométrica foi realizada a partir da asa esquerda de *P. megistus* machos e fêmeas capturados nos municípios de Bambuí e Piracema. As ninfas encontradas (com resultado parasitológico negativo) foram mantidas no insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas

(LATEC) em ambiente climatizado (28 °C, UR 80%). A alimentação destes indivíduos foi realizada com aves domésticas (*Gallus gallus* e *Columbia livia*) uma vez por semana. Após a ecdise imaginal os indivíduos foram armazenados em tubos Eppendorff® (2 mL) à - 70°C, até o momento da análise. Para as análises foram capturadas fotos das asas de *P. megistus* com auxílio de câmera digital Sony® (modelo FD – Mavica) e estereomicroscópio Zeiss (8x). Foram utilizados cinco Pontos Anatômicos de Referência (PAR) na região membranosa do hemiélitro. Todos os pontos foram realizados pelo mesmo observador (Figura 7).



Figura 7 – Asa esquerda de *Panstrongylus megistus* com os cinco Pontos Anatômicos de Referência (PAR) utilizados nas análises populacionais por morfometria geométrica.

Os PAR foram marcados sobre as fotos digitalizadas com auxílio do programa COO (versão 36) (Dujardin & Slice 2006). Com base nos PAR foi realizada uma comparação do tamanho centróide, que é um estimador de tamanho isométrico, entre as populações através do programa MOG (versão 75). Este programa também realizou a Análise Generalizada de Procrustes (AGP), que atua na reescala, re-orientação e re-posição dos PAR, quantificando as variações entre os pontos e buscando uma melhor sobreposição. Uma Análise dos Componentes Principais (ACP) foi realizada (programa COV, versão 46), utilizando os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2). A partir desta análise foi realizada uma Análise Multivariada de Co-variância (*Multivariate Analysis of Co-variance* - MANCOVA), verificando a contribuição do resíduo alométrico entre as populações. Através do programa PAD (versão 89) foi realizada uma análise discriminante, onde foram calculadas as distâncias de Mahalanobis entre as populações. Esta análise

realiza uma reclassificação dos indivíduos entre as populações e forma uma árvore UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) a partir das distâncias de Mahalanobis (Dujadin 2011).

Para caracterização geral das populações de *P. megistus* através da morfometria geométrica foi realizada uma análise inicial utilizando-se 146 indivíduos de Bambuí (54 machos e 92 fêmeas) e 105 de Piracema (47 machos e 58 fêmeas), totalizando 251 indivíduos. Com o objetivo de caracterizar as populações domésticas e silvestres dos municípios estudados, convencionou-se que os barbeiros adultos capturados em residências sem a presença de ninfas (ausência de colônias) representariam amostras do ambiente natural (AN). Os barbeiros obtidos em colônias peridomiciliares representariam amostras do ambiente artificial (AA). Desta maneira, foram formados quatro grupos de indivíduos: 1) Bambuí – AN (28 machos e 45 fêmeas), 2) Bambuí – AA (26 machos e 46 fêmeas), 3) Piracema – AN (46 fêmeas e 40 machos) e 4) Piracema – AA (12 fêmeas e 7 machos). Dado o fato que o grupo AA de Piracema apresentava uma população de 7 indivíduos, foram realizadas análises adicionais (*Relative Warps*) no programa PAD.

4.2.3.6 Licenças para coleta de material biológico

As atividades realizadas neste trabalho estão de acordo com as leis brasileiras (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA: 16217-3 – 2008 e Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA (FIOCRUZ): P-0502/08.

5 RESULTADOS

Os resultados desse estudo serão apresentados a seguir em cinco grupos de dados que correspondem aos objetivos específicos propostos. Em síntese, serão abordados dados sobre a infestação e dispersão domiciliar de *P. megistus*, a dinâmica populacional do barbeiro através da morfometria geométrica e a interrelação dos ciclos de transmissão do *T. cruzi* a partir dos reservatórios e vetores associados.

5.1 Caracterização da infestação domiciliar e da dispersão de *Panstrongylus megistus* nas áreas de estudo a partir dos dados do Programa de Controle da doença de Chagas ao longo dos anos.

I – Caracterização da infestação domiciliar de *P. megistus* no município de Bambuí.

A caracterização da infestação triatomínica no município de Bambuí foi avaliada a partir de dados históricos da VE da década de 70 (1974 a 1980), duas pesquisas integrais (PI) (1983 e 1990) e dados atuais (2004 a 2010). Na década de 70, *P. megistus* representava 97% (697/717) das notificações domiciliares, sendo o período entre 1974 e 1975 o de maior encontro da espécie (56% - 393/647). Nos períodos avaliados posteriormente, pode ser observada uma nítida redução no encontro destes barbeiros pelos moradores, 24% entre 1977-78 e 20% entre 1979-80. A ocorrência de *T. infestans*, por outro lado, já se mostrava esporádica, correspondendo a 3% (20/717) do total de triatomíneos amostrados na década, sendo assinalada pela última vez entre os anos de 1977 e 1978 (TABELA 2).

TABELA 2 – NOTIFICAÇÕES DE BARBEIROS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ NA DÉCADA DE 70 (1974-75, 1977-78 E 1979-80) (Fonte: PAEED).

ESPÉCIES	PERÍODOS						Total de notificações
	1974-75		1977-78		1979-80		
	Not.*	Local.**	Not.*	Local.**	Not.*	Local.**	
<i>P. megistus</i>	393	68	167	60	137	54	697 (97%)
<i>T. infestans</i>	13	6	7	4	0	0	20 (3%)
TOTAL	406	74	174	64	137	54	717

A redução das notificações de *P. megistus* observada no final da década de 70, pode ser constatada na primeira PI realizada no município, em 1983, onde foram coletados 192 *P. megistus* em 90 unidades domiciliares (UDs) de 46 localidades diferentes. Na segunda PI realizada (1990), embora tenha ocorrido uma pequena variação no número de UD's (81) e localidades positivas (50), foram capturados de 238 indivíduos. A partir de 2004, a redução da ocupação da espécie nos domicílios, bem como sua dispersão no município, torna-se evidente (Figura 8).

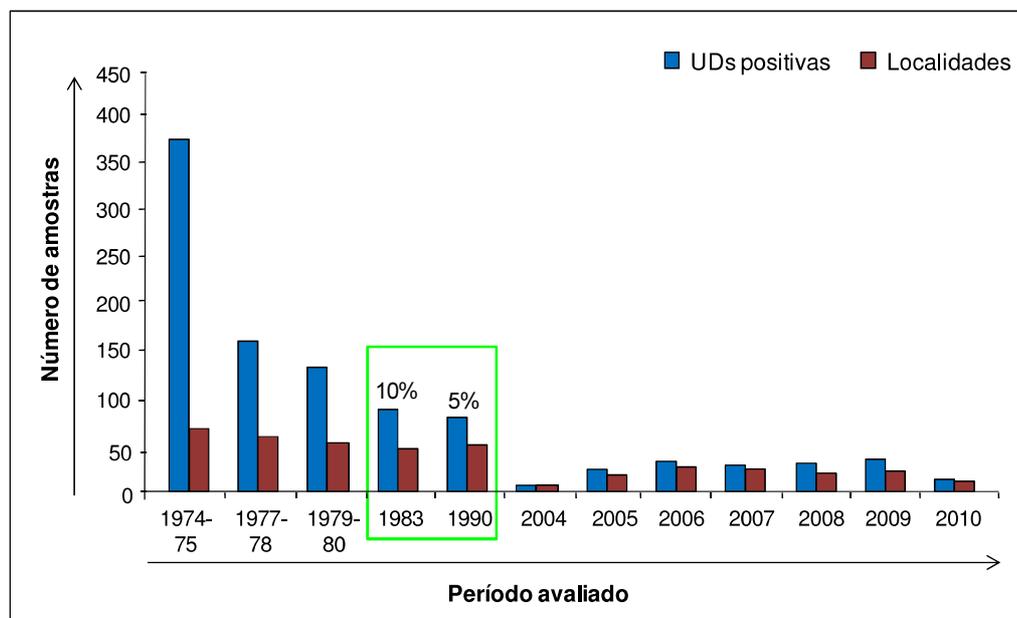


Figura 8 - Número de unidades domiciliares (UDs) e localidades positivas com presença de *Panstrongylus megistus* no município de Bambuí, a partir dos dados do período inicial (1974-80), pesquisas integrais (1983 e 1990 – em destaque) e dados atuais (2004 a 2010). O índice de infestação está representado sobre as barras de UD's positivas dos anos 1983 e 1990 (Fonte: Programa de Controle da doença de Chagas).

A partir dos dados da VE de Bambuí (2004 a 2010), foram obtidos 361 *P. megistus* em 36% (73/203) das localidades do município. Neste período foram realizadas 172 notificações que levaram ao encontro de 228 indivíduos (55 machos, 120 fêmeas e 53 ninfas) e 78 atendimentos positivos com a captura de 132 indivíduos (28 machos, 41 fêmeas e 63 ninfas). Como demonstrado na Figura 8, observa-se uma franca redução da infestação triatomínica no período atual, com uma estabilidade nas notificações anuais e dispersão do barbeiro. Além do *P. megistus*, os dados avaliados do PCDCH apresentaram apenas a espécie *Panstrongylus diasi* (Pinto & Lent, 1946), notificada no ano de 2005 nas localidades de Pau Ferro (1♀), Sertãozinho (1♀) e Posses (1 ninfa), concomitante à presença de *P. megistus* e ausência de infecção por *T. cruzi*.

Entre as notificações realizadas no município, observa-se que 69% (118/172) ocorreram no ambiente intradomiciliar (139 indivíduos). Os atendimentos positivos realizados, por outro lado, foram constatados com maior frequência no ambiente peridomiciliar (76% - 59/78), obtendo-se 105 *P. megistus* (Figura 9). Os atendimentos positivos no intradomicílio representaram 24% (19/78) da amostra e, embora presentes em quase todos os anos avaliados, foram menos frequentes que os peridomiciliares. No ano de 2010, embora tenham-se realizados os atendimentos às notificações encaminhadas, não foram encontrados barbeiros nas casas vistoriadas.

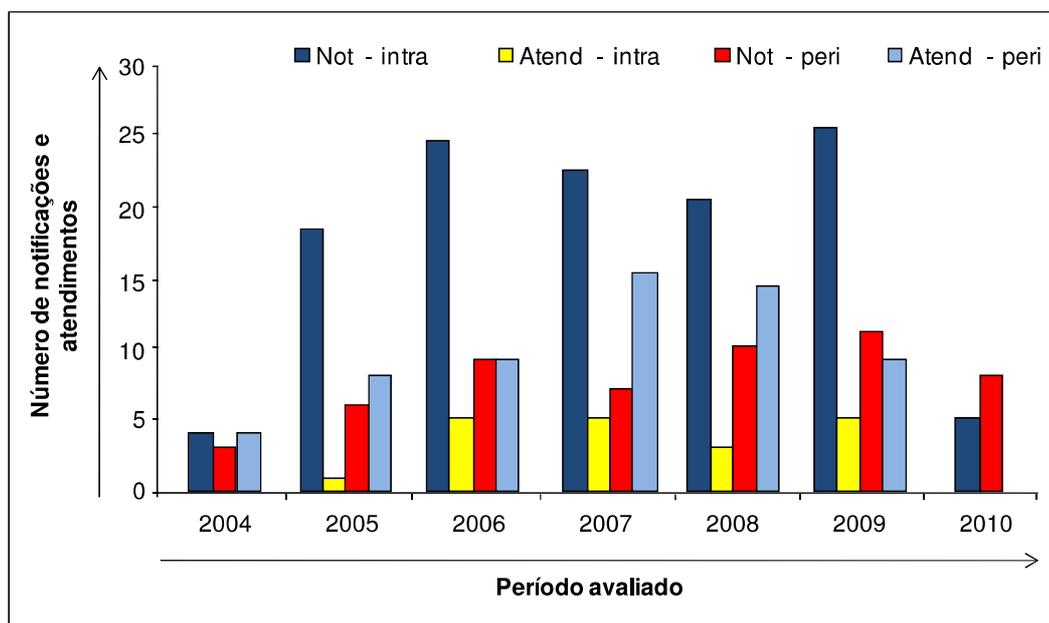


Figura 9 – Notificações (Not) e atendimentos (Atend) associados ao intradomicílio (Intra) e peridomicílio (Peri) no município de Bambuí entre os anos de 2004 e 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).

Entre os anos de 2004 a 2009 foi observado um aumento no número de indivíduos obtidos através das notificações ($r^2 = 0,78$; $p < 0,01$), com maior ocorrência em 2009 (50 triatomíneos). Associado ao aumento das notificações, também foi observado um aumento nos atendimentos positivos ($r^2 = 0,94$; $p < 0,01$), melhor observado após 2007. O ano 2010 foi desconsiderado na análise acima, dado o

enfraquecimento das atividades do PCDCH, o que poderia levar a interpretações subestimadas dos dados (Figura 10).

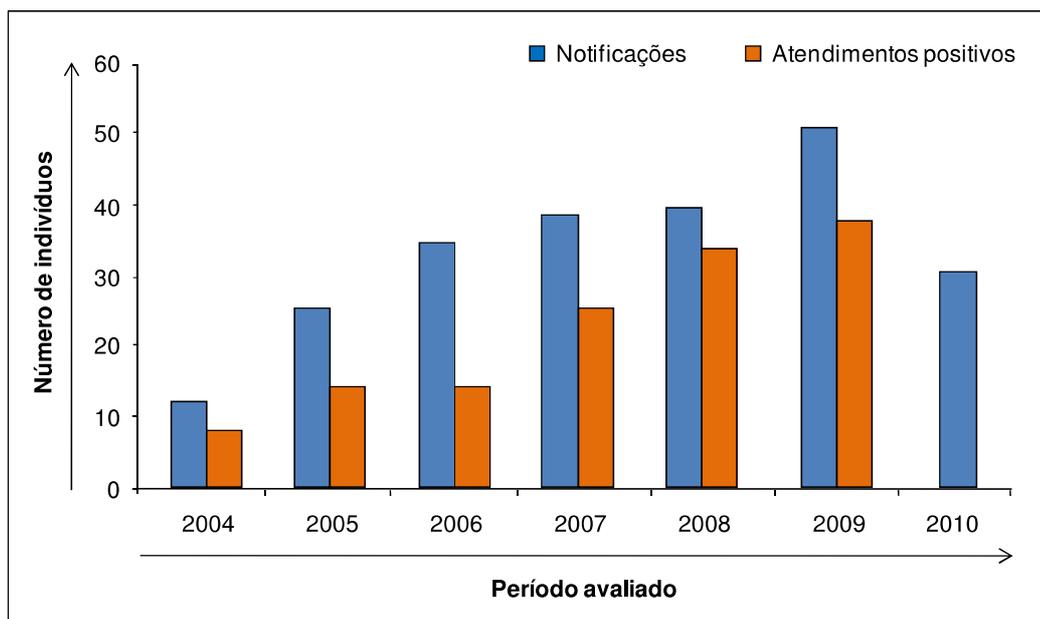


Figura 10 – Número de *Panstrongylus megistus* capturados em notificações e atendimentos positivos no município de Bambuí entre os anos de 2004 e 2010. Em 2010 não houve atendimentos positivos (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).

Nas notificações, o aumento de indivíduos observado ao longo dos anos, pode ser atribuído à maior presença de fêmeas do que machos e ninfas. No intradomicílio, o maior número de capturas ocorreu no quarto (41% - 57/139), na cozinha (27% - 37/139) e na sala (26% - 36/139), havendo uma predominância de fêmeas (63% - 88/139) em todos ecótopos analisados. No peridomicílio, a maior parte dos indivíduos foi obtida nos galinheiros (35% - 31/89) e paióis (31% - 28/89). O número de adultos e ninfas variou entre os ecótopos, ocorrendo um maior encontro de fêmeas (34% - 11/32) e ninfas (35% - 12/34) nos galinheiros e de insetos adultos (11 machos e 11 fêmeas, 78% - 22/28) nos paióis.

Nos atendimentos, por outro lado, o maior encontro de barbeiros está associado à presença de ninfas, principalmente no peridomicílio (50% - 53/105). O quarto (59% - 16/27) também foi o ecótopo de maior frequência de triatomíneos no intradomicílio, com o predomínio de ninfas (56% - 9/16), seguido de fêmeas. No

peridomicílio, o maior encontro de indivíduos também foi nos galinheiros (46% - 48/105) e paióis (36% - 38/105). Nos dois ecótopos houve um predomínio de ninfas 46% (22/48) e 50% (19/38), respectivamente. Os dados sobre a captura dos barbeiros nas notificações e atendimentos do município de Bambuí estão detalhados na (TABELA 3).

TABELA 3 - NÚMERO DE *Panstrongylus megistus* (MACHOS, FÊMEAS E NINFAS) CAPTURADOS NOS DIFERENTES ECÓTOPOS INTRADOMICILIARES E PERIDOMICILIARES, A PARTIR DE NOTIFICAÇÕES E ATENDIMENTOS REALIZADOS NO MUNICÍPIO DE BAMBUI, ENTRE OS ANOS DE 2004 E 2010 (FONTE: PROGRAMA DE CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS).

	NOTIFICAÇÕES (Not)				ATENDIMENTO (Atend)				Total Geral	
	Ecótopos	Macho	Fêmea	Ninfa	Total ecótopos	Macho	Fêmea	Ninfa		Total ecótopos
Intradomicílio (intra - n=166)	Cozinha	9	23	5	37 (27%)	2	1	0	3 (11%)	40
	Quarto	10	36	11	57 (41%)	2	5	9 (56%)	16 (59%)	73
	Sala	11	22	3	36 (26%)	4	1	0	5 (21%)	41
	Varanda	1	3	1	5 (4%)	0	1	0	1 (4%)	6
	Outros	0	4	0	4 (3%)	0	1	1	2 (7%)	6
	Total Intra	31 (22%)	88 (63%)	20 (14%)	139	9	9	10	27	166
Peridomicílio (Peri - n=194)	Chiqueiro	0	0	1	1 (1%)	0	0	0	0	1
	Forno	0	2	7	9 (10%)	0	0	0	0	9
	Galinheiro	8	11 (34%)	12 (39%)	31 (35%)	8	18	22 (46%)	48 (46%)	79
	Outros	2	6	5	13 (15%)	3	2	11	16 (15%)	29
	Paiol	11	11	6	28 (31%)	7	12	19 (50%)	38 (36%)	66
	Pilha de lenha	2	2	0	4 (4%)	2	0	0	2 (2%)	6
	Paiol com lenhas e galinhas	0	0	2	2 (2%)	0	0	1	1 (1%)	3
	Pilha de Telhas	0	0	1	1 (1%)	0	0	0	0	1
	Total Peri	23	32	34	89	20	32	53 (50%)	105	194
Total Geral	54	120	54	228	29	41	63	132	360	

A partir da análise das notificações (172) e dos atendimentos (78) ocorridos entre 2004 e 2010, em Bambuí, nota-se uma baixa reinfestação do ambiente domiciliar, sendo que apenas 15% (26/172) das notificações ocorreram na mesma residência, ao longo do período analisado. Entre estas, 5% (9/172) ocorreram até três meses da primeira notificação, o que pode estar associado aos barbeiros mortos na primeira borrifação. Nas demais casas, 10% (17/172) ocorreram após seis meses da primeira notificação (a maior parte após um ano). Foi observado que apenas 20% (34/172) das notificações e 37% (29/78) dos atendimentos positivos demonstraram presença de ninfas nas residências.

A análise da distribuição sazonal de *P. megistus* no município de Bambuí foi realizada com base nas capturas dos 361 indivíduos obtidos (notificações e atendimentos) entre 2004 e 2010. A Figura 11, representa o percentual de indivíduos encontrados a cada mês, permitindo verificar a maior presença de fêmeas entre janeiro e maio. Após o mês de maio ocorreu uma inversão dos estágios de *P. megistus* passando a predominar a presença de ninfas. A incidência máxima das ninfas ocorreu no mês de julho (87%). Entre agosto e setembro, observa-se uma variação no número de adultos e ninfas, onde a redução gradual do número das ninfas é acompanhada por um aumento no número de machos (que se manteve baixo entre janeiro e agosto) e uma variação na incidência das fêmeas com um pico em agosto (47%) e uma queda em setembro (24%). A partir de outubro, foi possível observar uma constância nas infestações domiciliares, com predomínio das formas adultas.

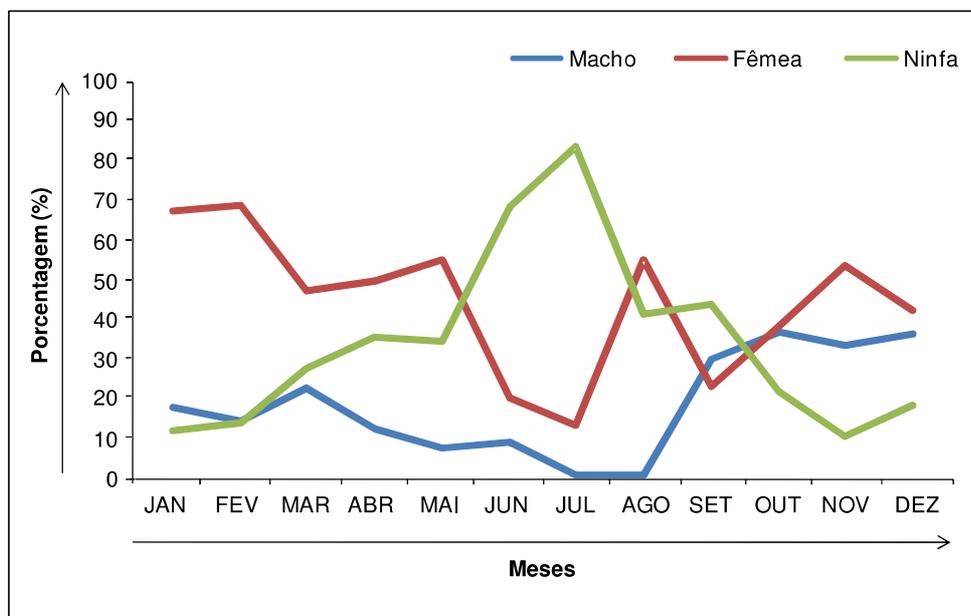


Figura 11 – Distribuição sazonal de *Panstrongylus megistus* obtidos através de notificações e atendimentos positivos no município de Bambuí entre os anos de 2004 e 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).

II – Caracterização da infestação domiciliar de *Panstrongylus megistus* no município de Piracema.

A caracterização da infestação triatomínica domiciliar no município de Piracema foi avaliada a partir de dados históricos do PCDCH a partir do levantamento triatomínico (LT) em 1976 e as avaliações (AV) entre 1979 e 1993 (AV-I a AV-XIX). A partir do LT realizado nas 36 localidades do município, foi encontrado *P. megistus* em 25 localidades e 2,2% (23/1044) das unidades domiciliares (UDs). Após o ataque triatomínico (em 1977 e 1978), embora a dispersão do barbeiro não tenha sido alterada, houve uma redução na infestação domiciliar, encontrando-se o barbeiro em 0,3% das UD.

As avaliações seguiram até o ano de 1993, com uma redução significativa tanto no número de localidades ($r^2=0,38$; $p<0,001$) como nas UD infestadas ($r^2=0,63$; $p<0,001$). A AV-IV (1982) apresentou a maior incidência de barbeiros, sendo encontradas 80 UD e 28 localidades, ao contrário a AV-IX, apresentou a

menor incidência, 14 UD's e 11 localidades (Figura 12). Após a AV-IX, observa-se uma redução na infestação triatomínica em Piracema, sendo que antes desta avaliação foram somadas 486 UD's positivas, com um Índice de Infestação Domiciliar (IID) de 0,05 ($\pm 0,01$), e depois 294 UD's (IID = 0,02 $\pm 0,007$), podendo representar, desta maneira, o momento da consolidação da luta antivetorial realizada no município.

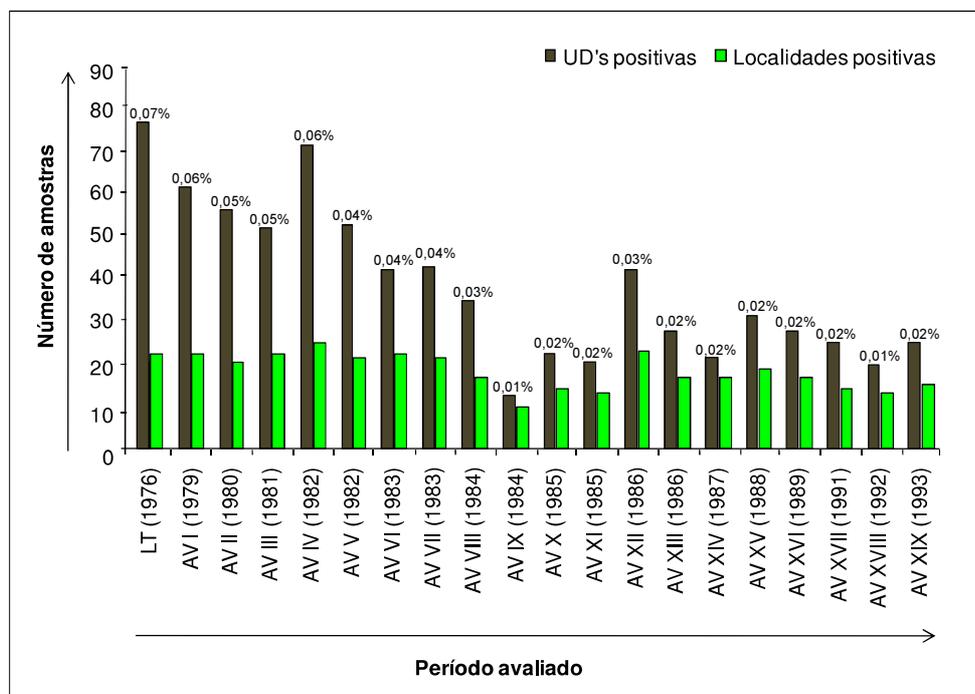


Figura 12 – Número de unidades domiciliares (UD's) e localidades positivas para *Panstrongylus megistus* entre os anos de 1976 e 1993 no município de Piracema. O índice de infestação está representado sobre as barras UD's positivas (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).

O número de barbeiros capturados foi avaliado em dois períodos, representados pelo início das avaliações (AV-I a AV-III) e pelo final (AV-XVI a AV-XIX). No primeiro período foram obtidos 569 *P. megistus* obtidos em 86% (31/36) das localidades do município. No segundo período, foi observada uma redução na captura do barbeiro, obtendo-se 184 indivíduos, entretanto esta redução não foi observada na dispersão do triatomíneo (80% - 29/36) (TABELA 4).

TABELA 4 - OCORRÊNCIA DE *Panstrongylus megistus* A PARTIR DE DADOS OBTIDOS NAS DIFERENTES AVALIAÇÕES (AV) REALIZADAS (1979-1981 E 1989-1993) NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.

<i>Panstrongylus megistus</i>	AV 1 a 3				AV 16 a 18				Total
	1979	1980	1981	AV 1 a 3	1989	1991	1993	AV 16 a 18	
Nº de indivíduos capturados	217	137	215	569	66	73	45	184	753
Localidades positivas	24	22	26	31*	18	18	17	29*	32*

* Localidades diferentes

A avaliação da infestação triatomínica atual do município de Piracema foi baseada em dados do PCDCH obtidos entre 2004 e 2010. A partir do final da década de 90, com a descentralização do PCDCH o município passou a apresentar 59 localidades. As atividades realizadas nos últimos sete anos da VE, permitiram a captura de 462 *P. megistus* em 75% (44/59) das localidades do município. Neste período foram realizadas 253 notificações, que levaram ao encontro de 297 indivíduos (105 machos, 130 fêmeas e 62 ninfas) e 81 atendimentos positivos, com a captura de 165 indivíduos (13 machos, 47 fêmeas e 105 ninfas). A única espécie notificada e encontrada no ambiente domiciliar, além de *P. megistus*, foi *P. diasi*. Esta espécie foi encontrada em quatro localidades, sempre no intradomicílio: Coqueiros (1♀) e Condé (1♂) (sala), Paracatú (1♀) e Peróbas de Cima (1♂) (cozinha). Todos os exemplares eram fêmeas e não estavam infectadas por *T. cruzi*. Todos os atendimentos foram negativos para este barbeiro.

No município de Piracema, 79% (201/253) das notificações ocorreram com o encontro do barbeiro no ambiente intradomiciliar (223 indivíduos). Os atendimentos positivos, por outro lado, foram mais freqüentes no peridomicílio (57% - 46/81), obtendo-se 102 barbeiros (Figura 13). Apenas em 2004 o número de atendimentos positivos foi maior no intradomicílio (9) que no peridomicílio (7).

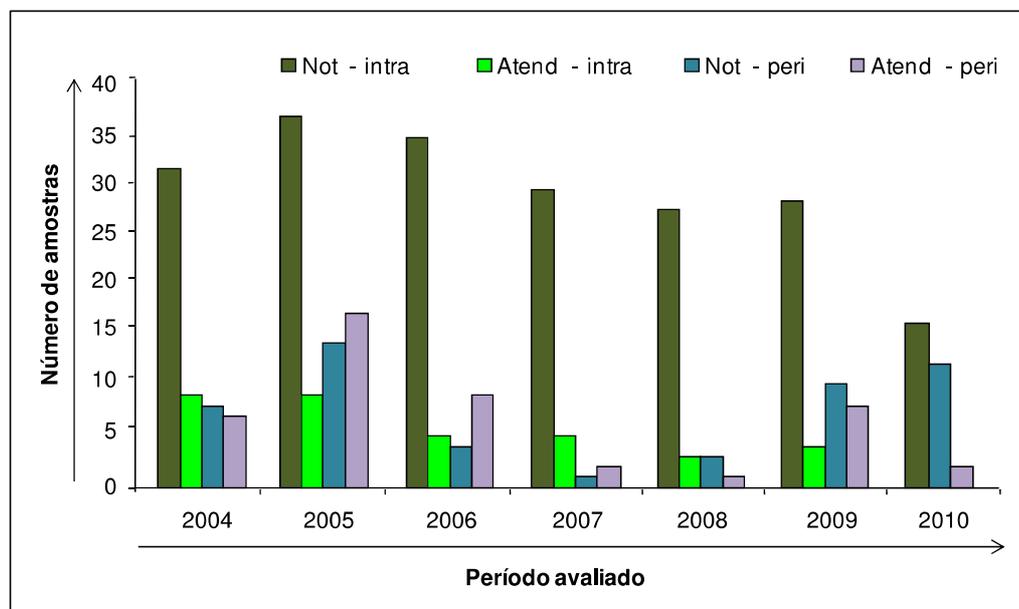


Figura 13 - Notificações (Not) e atendimentos (Atend) associados ao intradomicílio (intra) e peridomicílio (peri) no município de Piracema entre os anos de 2004 e 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).

Entre os anos de 2004 a 2010 não foram observadas diferenças estatísticas no número de notificações e dispersão da espécie ($p > 0,05$), entretanto foi possível detectar uma redução no número de atendimentos positivos ($r^2 = 0,47$, $p < 0,05$), principalmente após o ano de 2006 (Figura 14).

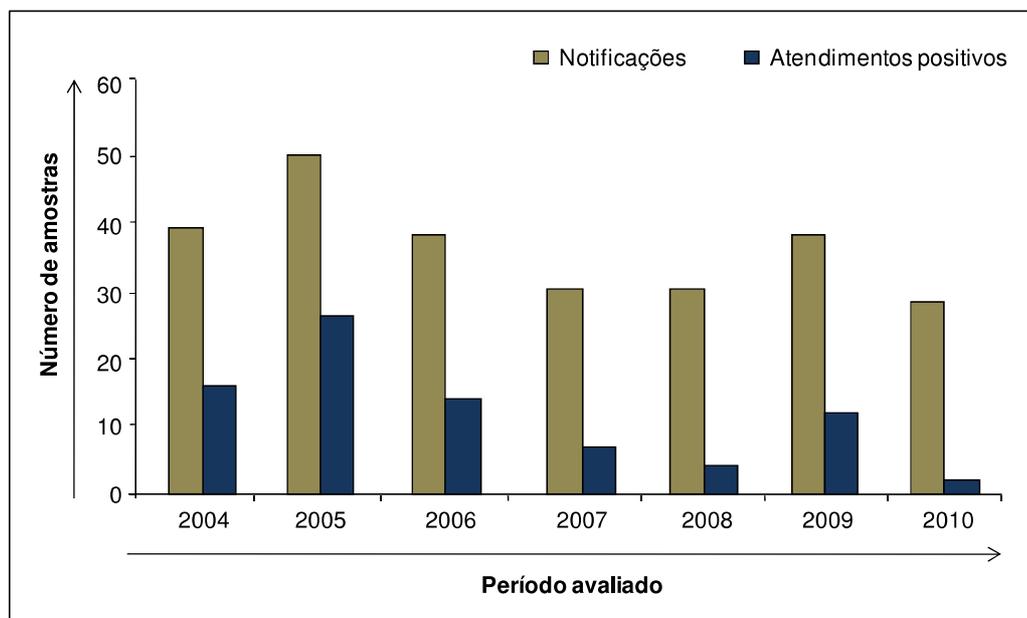


Figura 14 – Número de *Panstrongylus megistus* capturados em notificações e atendimentos positivos no município de Piracema entre os anos de 2004 e 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).

As notificações de *P. megistus* observadas no município de Piracema foram compostas, principalmente, por fêmeas (44% - 130/297) e machos (35% - 105/297) capturados tanto no peridomicílio como no intradomicílio. A avaliação dos ecótopos intradomiciliares demonstrou um maior encontro de triatomíneos no quarto (43% - 97/223), seguido da sala (35% - 78/223). No peridomicílio, a maior parte das capturas dos moradores ocorreu nos galinheiros (40% - 30/74) e paiós (30% - 22/74). O estágio mais freqüentemente observado foi o ninfal, nos ambientes intradomiciliar (63% - 19/30) e peridomiciliar (64% - 14/22).

Nos atendimentos, o quarto (84% - 53/63) e o galinheiro (66% - 67/102) foram os principais ecótopos artificiais de *P. megistus*, demonstrando um predomínio de ninfas, 68% (36/53) e 70% (47/67), respectivamente. Os dados sobre as capturas realizadas nas notificações e atendimentos do município de Piracema estão detalhados na TABELA 5.

TABELA 5 - NÚMERO DE *Panstrongylus megistus* (MACHOS, FÊMEAS E NINFAS) CAPTURADOS NOS DIFERENTES ECÓTOPOS INTRADOMICILIARES E PERIDOMICILIARES, A PARTIR DE NOTIFICAÇÕES E ATENDIMENTOS REALIZADAS NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA, ENTRE OS ANOS DE 2004 E 2010 (FONTE: PROGRAMA DE CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS).

		NOTIFICAÇÕES (Not)				ATENDIMENTO (Atend)				
	Ecótopos	Macho	Fêmea	Ninfa	Total ecótopos	Macho	Fêmea	Ninfa	Total ecótopos	Total Geral
	Outros	9	10	1	20	1	0	0	1	21
	Quarto	26	57	14	97 (43%)	3	14	36 (68%)	53 (84%)	150
	Sala	41	32	5	78 (35%)	2	5	2	9	107
	varanda	2	0	0	2	0	0	0	0	2
	Total Intra	89	113	21	223	6	19	38	63	286
Peridomicílio (Peri - n=176)	Chiqueiro	1	0	0	1	0	1	0	1	2
	Galinheiro	3	8	19 (63%)	30 (40%)	7	13	47 (70%)	67 (66%)	97
	Outros	5	5	1	11	0	2	7	9	20
	Paio	7	1	14 (64%)	22 (30%)	0	8	9	17	39
	Pilha de lenha	0	3	7	10	0	4	4	8	18
	Total Peri	16	17	41	74	7	28	67	102	176
	Total Geral	105 (35%)	130 (44%)	62	297	13	47	105	165	462

Em Piracema, pelo menos 25% das notificações foram encontradas na mesma residência. Foi observado que apenas em 11% (33/297) das notificações e 30% (49/165) dos atendimentos foram encontradas ninfas nas residências vistoriadas. A análise da distribuição sazonal de *P. megistus* no município de Piracema foi realizada com base nas capturas dos 462 indivíduos obtidos (notificações e atendimentos) entre 2004 e 2010. A Figura 15, demonstra o percentual de indivíduos encontrados a cada mês, permitindo verificar uma maior

presença das ninfas nos primeiros oito meses do ano. Observa-se a predominância entre março e agosto, e a incidência máxima em maio (88%). Neste período, os indivíduos adultos, melhor representados por fêmeas, são encontrados em quantidades consideráveis (próximo as ninfas) até o mês de março, tendo sua presença reduzida no ambiente domiciliar até o mês de agosto. Entre agosto e outubro, observa-se uma variação no número de insetos adultos e imaturos, apresentando uma queda no número de ninfas (33%) e um pico nas fêmeas (44%). Após outubro, ocorre uma inversão nos estágios, com predominância de adultos até o final do ano.

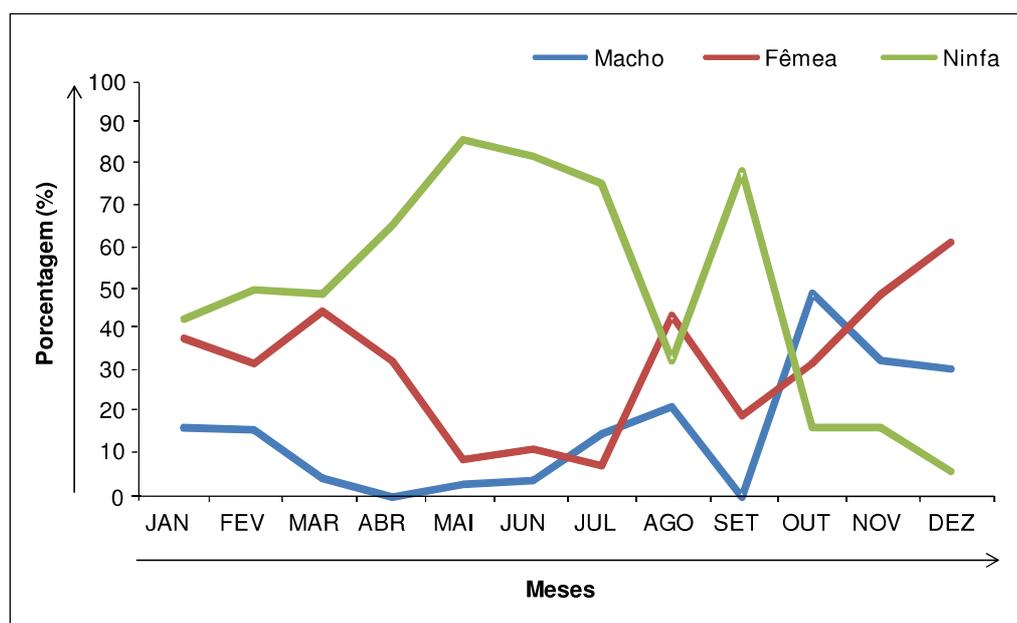


Figura 15 - Distribuição sazonal de *Panstrongylus megistus* obtidos através de notificações e atendimentos no município de Piracema entre os anos de 2004 e 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).

III – Avaliação da dispersão de *Panstrongylus megistus* associada à diferentes classes de vegetações nos municípios de Bambuí e Piracema.

No município de Bambuí foram georreferenciados 112 pontos representando as notificações de *P. megistus* entre 2004 e 2010. Observou-se que, 27% (30/112) se encontraram até 200 m de uma das classes de vegetações avaliadas (Campo,

Cerrado Denso, Cerrado Típico, Eucalipto e Floresta Semidecídua) (Figura 16). Entre as residências foi observado que 87% (26/30) demonstraram proximidade para apenas uma classe de vegetação avaliada e 13% (4/30) as duas classes (Figura 17).

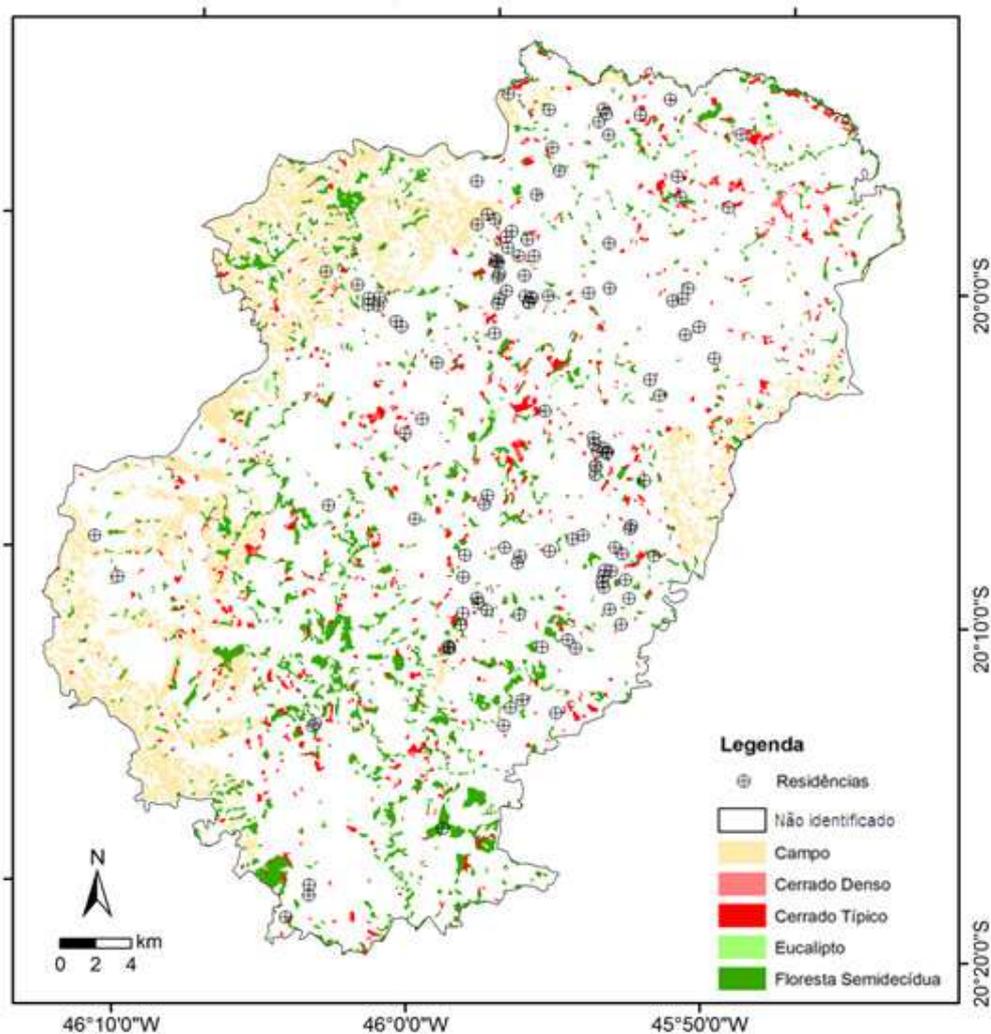


Figura 16 – Mapa da vegetação do município de Bambuí (referente ao ano de 2003), demonstrando os pontos georreferenciados das residências com notificações de *Panstrongylus megistus* entre os anos de 2004 e 2010 e sua proximidade com as diferentes classes de vegetações analisadas.

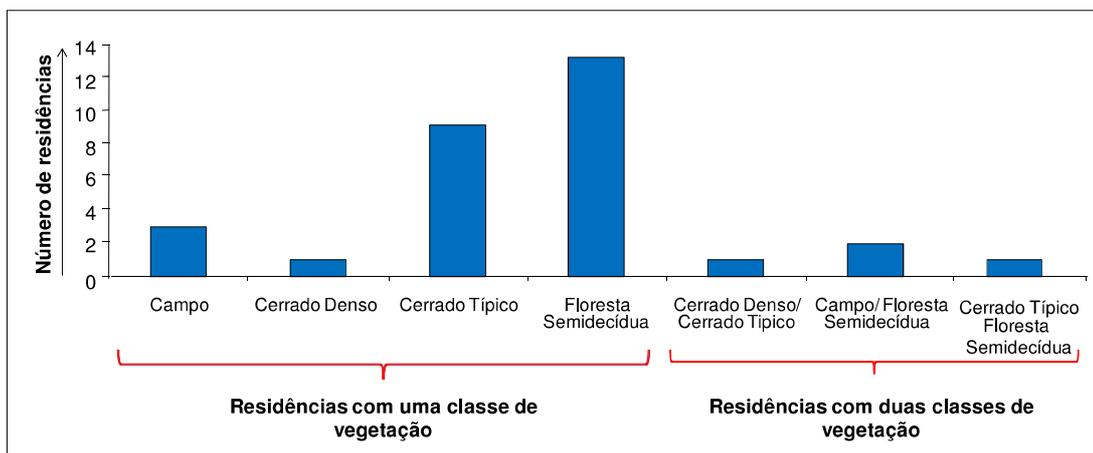


Figura 17 - Avaliação da proximidade das residências com notificações de *Panstrongylus megistus* entre os anos de 2004 e 2010, com uma ou duas classes de vegetações analisadas no município de Bambuí.

A análise de proximidade associou as classes de vegetações avaliadas a 34 pontos em Bambuí (considerando casas associadas às duas classes da análise anterior). Entre estes pontos, 47% (16/34) foram relacionados à Floresta Semidecídua, sendo que esta classe ocorreu em praticamente todas as distâncias analisadas, com um maior encontro entre >140 e 160m. O Cerrado Típico foi a segunda classe mais freqüente, relacionado a 32% (11/34) dos locais (Figura 18).

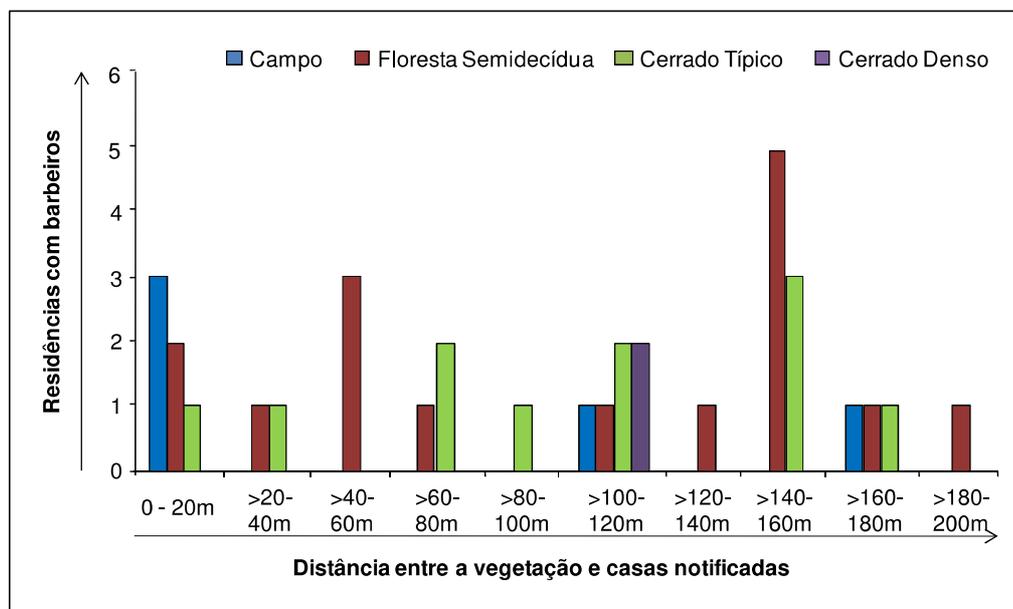


Figura 18 – Proximidade das diferentes classes de vegetações avaliadas de residências com notificações de *Panstrongylus megistus* entre os anos de 2004 e 2010 no município de Bambuí.

A partir da análise de proximidade realizada no município de Piracema, foi observado que 15% (21/141) das residências se encontraram até 200 m de uma das classes de vegetações avaliadas (Campo, Cerrado Típico e Floresta Semidecídua) (Figura 19). Entre as residências foi observado que 95% (20/21) demonstraram proximidade à apenas uma classe de vegetação avaliada e apenas uma residência (5%) à duas classes, Cerrado Típico/Floresta Semidecídua.

A análise de proximidade associou as vegetações a 21 pontos em Piracema, considerando a residência relacionada à mais de uma classe de vegetação. Entre estes pontos, 62% (13/21) foram relacionados à Floresta Semidecídua, sendo que após 40 m esta classe ocorreu em quase todas as distâncias analisadas, com maior frequência acima de 160 m. O campo foi a segunda classe mais frequente, relacionado à 24% (5/21) dos locais avaliados (Figura 20).

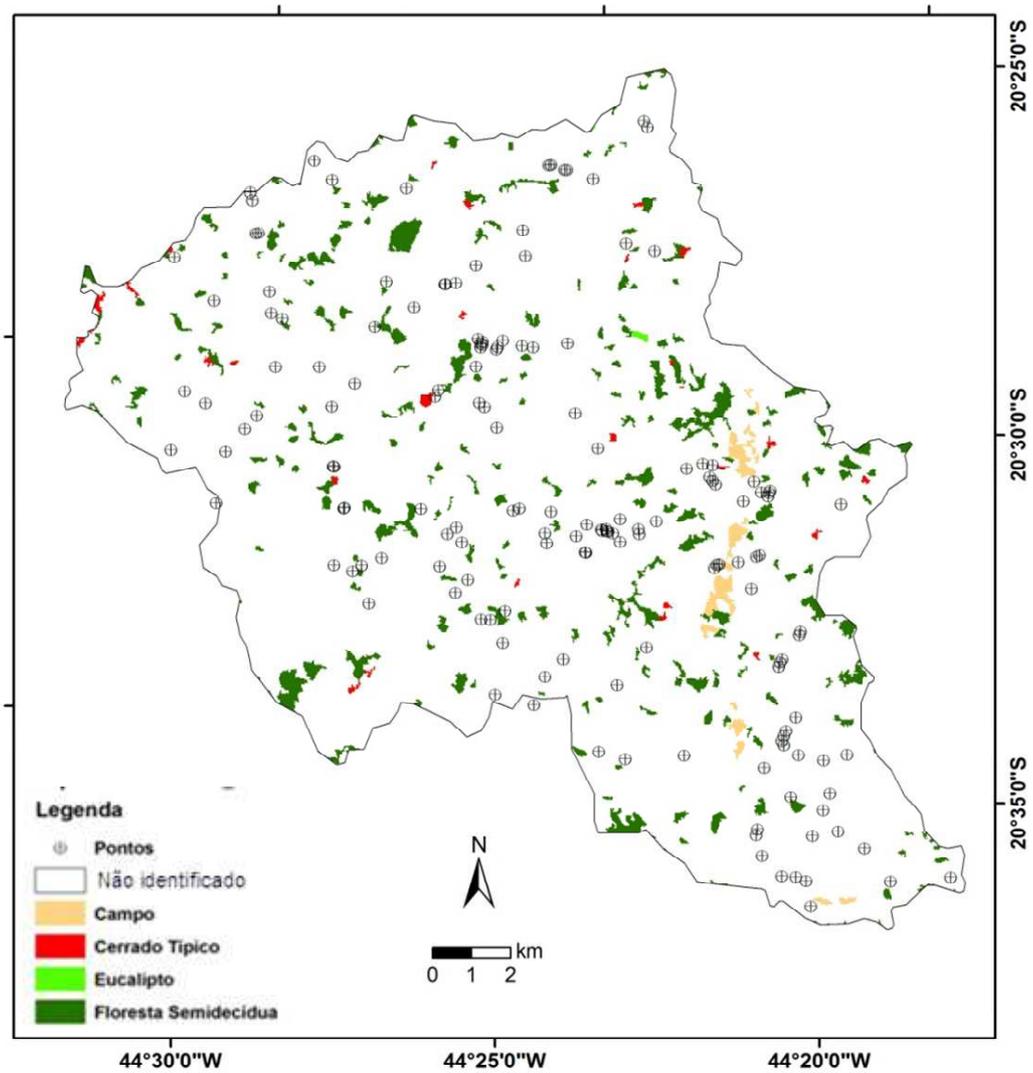


Figura 19 – Mapa da vegetação do município de Piracema (referente ao ano 2003), demonstrando os pontos georreferenciados das residências com notificações de *Panstrongylus megistus* entre os anos de 2004 e 2010 e sua proximidade com as diferentes classes de vegetações analisadas.

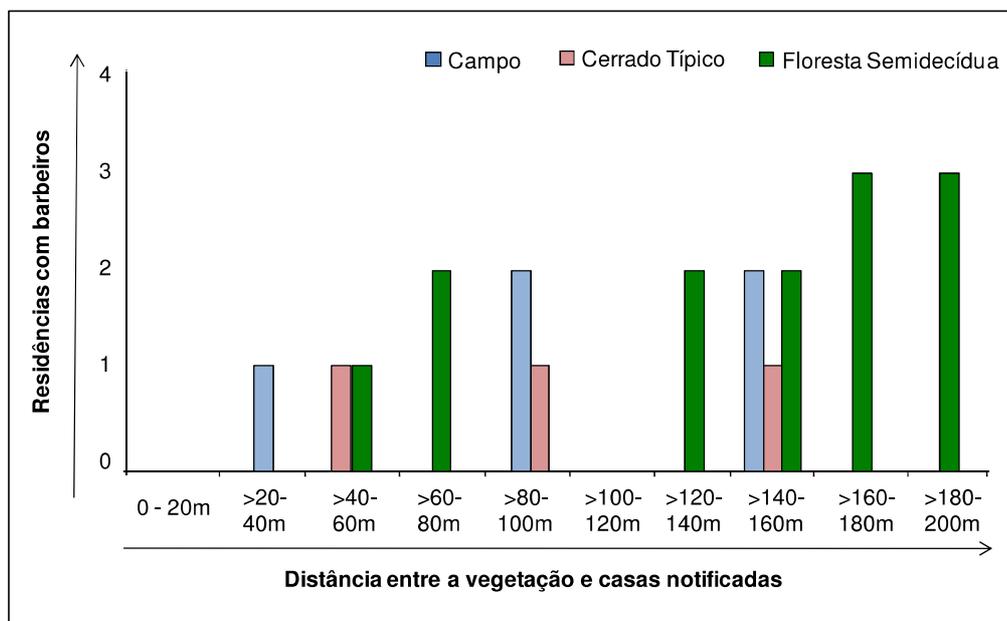


Figura 20 - Proximidade das diferentes classes de vegetações avaliadas de residências com notificações de *Panstrongylus megistus* entre os anos de 2004 e 2010 no município de Piracema.

5.2 Estudo da dinâmica de *Panstrongylus megistus* nas áreas de Cerrado e Mata Atlântica através da técnica de morfometria geométrica.

Para caracterização das populações de *P. megistus* através da morfometria geométrica, foram utilizados 146 indivíduos de Bambuí (54 machos e 92 fêmeas) e 105 de Piracema (47 machos e 58 fêmeas). Uma comparação inicial entre todos os indivíduos de cada município demonstrou um dimorfismo sexual consistente nas análises do tamanho do centróide (TC) das asas dos barbeiros. Tanto em Bambuí ($TC_{\text{f}}: 520 \pm 28$; $TC_{\text{m}}: 478 \pm 24$), como em Piracema ($TC_{\text{f}}: 520 \pm 20$; $TC_{\text{m}}: 481 \pm 21$), as asas das fêmeas foram significativamente maiores que as dos machos (test t = 9,26 e 9,69, respectivamente; $p < 0,0001$) (Figura 21).

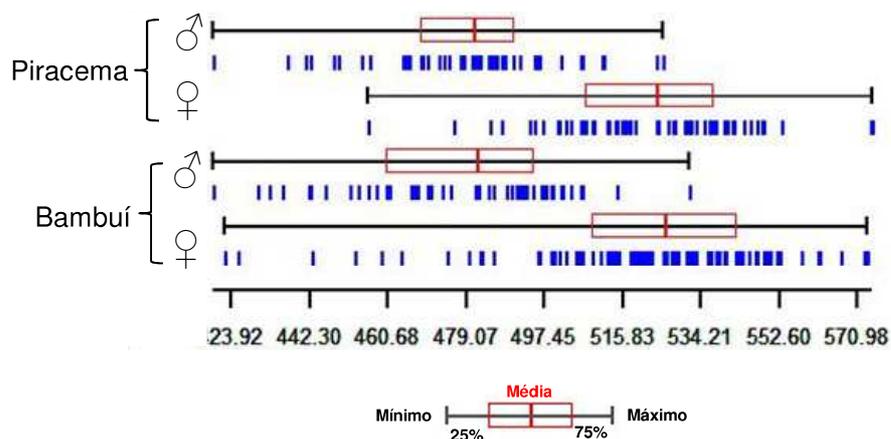


Figura 21 – Variação do tamanho centróide das asas entre os sexos e populações de *Panstrongylus megistus* de BambuÍ e Piracema. Os valores mostram a média, o máximo, o mínimo e quartis.

A avaliação do tamanho e da forma das asas das populações associadas aos ambientes natural (AN) e artificial (AA) demonstrou a presença de dimorfismo sexual nas populações associadas ao AN como AA de Bambuí ($p < 0,0001$). Entretanto, nas populações de Piracema, o dimorfismo foi constatado apenas nas populações do AN ($p < 0,05$) (Figura 22). As fêmeas associadas ao AN apresentaram um tamanho de asa maior (BambuÍ: 522 ± 33 ; Piracema: 523 ± 21) quando comparadas ao AA (BambuÍ: 479 ± 29 ; Piracema: 513 ± 19), entretanto não foram detectadas diferenças significativas. Não houve diferença significativa no tamanho das asas entre as populações AN e AA dos municípios estudados.

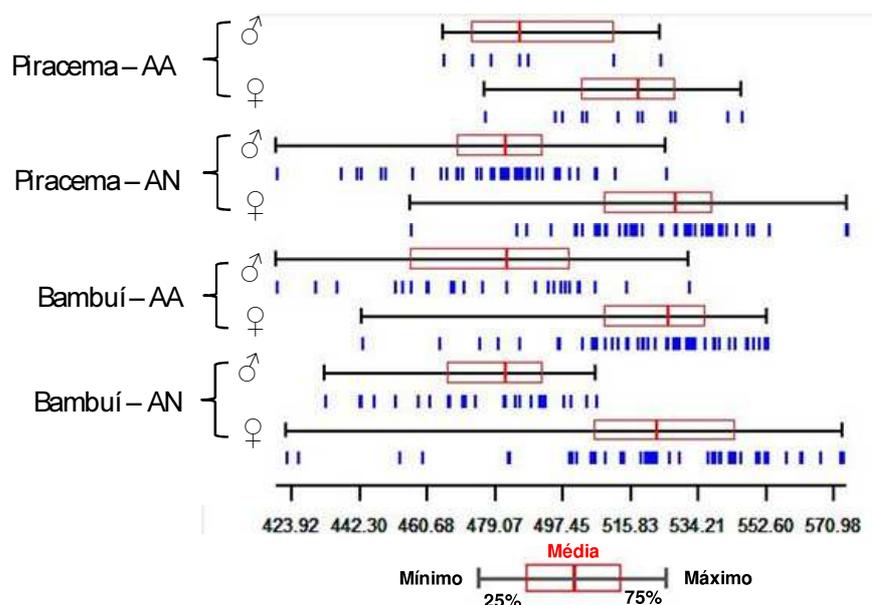


Figura 22 – Variação do tamanho centróide das asas entre os sexos e populações de *Panstrongylus megistus* (AN – ambiente natural, AA – ambiente artificial) de Bambuí e Piracema. Os valores mostram a média, o máximo, o mínimo e os quartis.

Considerando que a ausência de dimorfismo sexual observada na população AA de Piracema poderia estar associada ao menor número amostral, uma nova análise do TC foi realizada reduzindo-se aleatoriamente o número de indivíduos da população AN, equilibrando-a com a população do AA (12 fêmeas e 7 machos) (Figura 23). Nesta análise foi observada a permanência das características observadas anteriormente. No entanto, alguns fatores foram levados em consideração para a interpretação destes resultados: *a*) dois indivíduos, representando 30% da amostras, apresentaram valores de tamanho centróide acima dos demais; *b*) impossibilidade de re-análise, no caso de retirá-los como *out-liers*. Desta maneira, foi compreendido a necessidade de um número maior de capturas para uma compreensão adequada das populações do ambiente artificial do município. Assim, foi aceita a presença de dimorfismo sexual nas populações de Piracema, como demonstrado na primeira análise realizada (Figura 22).

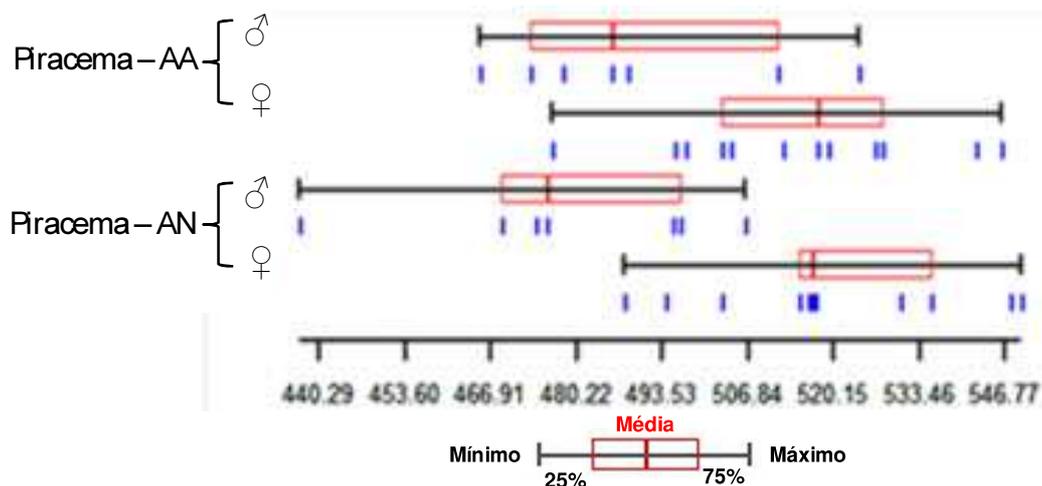


Figura 23 – Variação do tamanho do centróide das asas de *Panstrongylus megistus*, entre os sexos e entre as populações (AN – ambiente natural, AA – ambiente artificial) de Piracema, com população AN reduzida. Os valores mostram a média, o máximo, o mínimo e os quartis.

As análises de componentes principais (ACP) utilizando as variáveis da forma das asas não detectaram diferenças entre os sexos. Desta maneira, as análises foram realizadas agrupando machos e fêmeas, permitindo a análise de um maior número amostral. Os dados obtidos a partir da análise discriminante entre os indivíduos associados aos AN e AA de ambos municípios não demonstraram populações bem estruturadas (Figura 24), podendo ser observada uma grande sobreposição nos mapas fatoriais entre as populações.

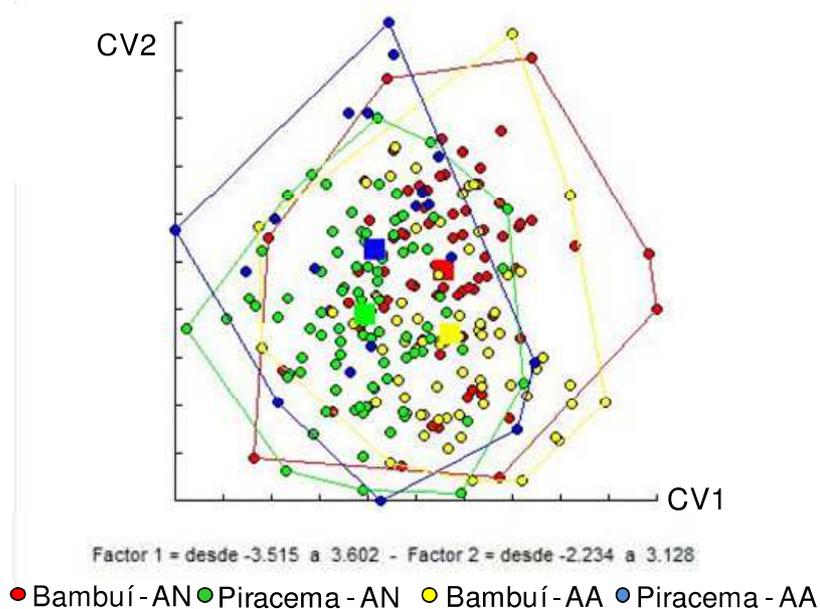


Figura 24 – Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma (CV1 e CV2) das asas de *Panstrongylus megistus*, mostrando a distribuição dos espécimes das populações associadas aos ambientes natural (AN) e artificial (AA) de Bambuí e Piracema. As cores correspondem aos grupos analisados no modelo discriminante.

Não foram observados efeitos alométricos consideráveis nas análises de regressão entre os componentes principais (CP1 e CP2) e o tamanho centróide. Em Bambuí (CP1: $r^2 < 0,01$; $p = 0,14$; CP2: $r^2 = 0,07$; $p = 0,001$), como em Piracema (CP1: $r^2 < 0,01$; $p = 0,3$; CP2: $r^2 = 0,04$; $p < 0,01$). Os coeficientes de determinação foram significativos somente para CP2 nas duas áreas amostradas.

5.3 Avaliação da presença de ecótopos naturais de *Panstrongylus megistus* nos municípios de Bambuí e Piracema.

No município de Bambuí, foram pesquisados através de busca ativa 123 ecótopos naturais em 13 localidades diferentes. Dos ecótopos analisados 5% (6/123) foram frestas entre pedras, 8% (10/123) ramada de cipós, 12% (15/123) ninhos de aves, 17% (21/123) palmeiras, 20% (25/123) buracos no chão e 46% (37/123) ocos e anfractuosidades em árvores (Figura 25).

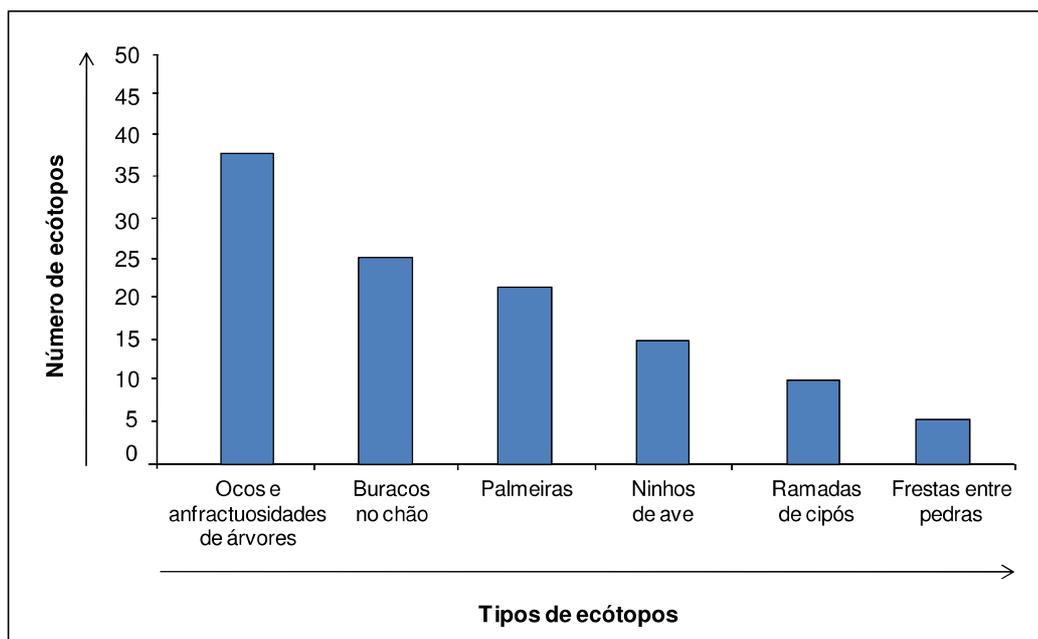


Figura 25 - Número de ecótopos naturais identificados através de busca ativa no município de Bambuí entre os meses de março/2008 e maio/2010.

No município de Piracema, foram pesquisados através de busca ativa 114 ecótopos naturais em cinco localidades diferentes. Dos ecótopos analisados 4% (4/114) ninhos de aves, 6% (7/114) palmeiras, 7% (8/114) ramadas de cipós, 18% (21/114) frestas entre pedras, 24% (27/114) buraco no chão e 41% (47/114) ocos e anfractuosidades de árvores (Figura 26).

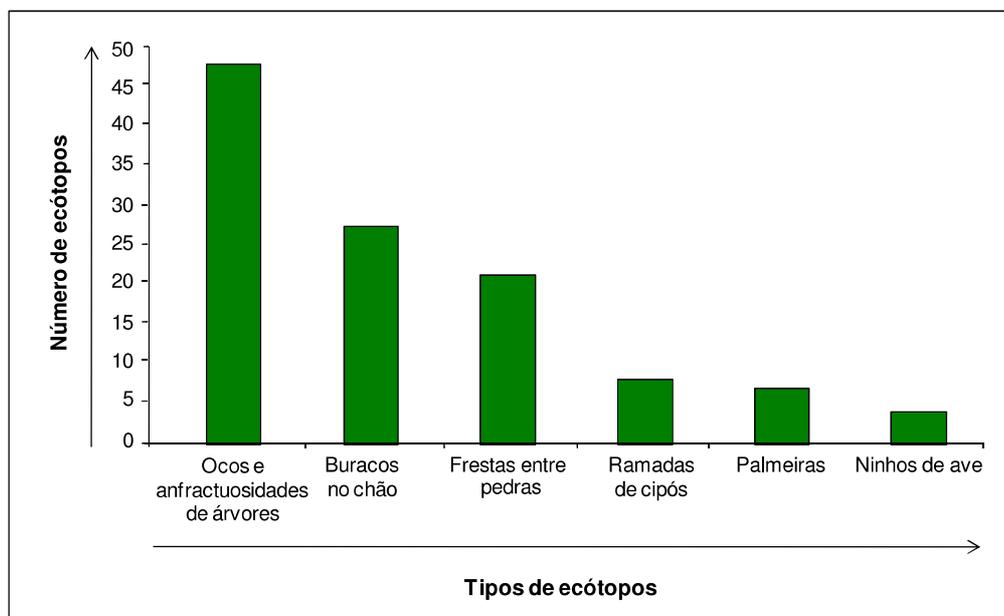


Figura 26 – Número de ecótopos naturais identificados através de busca ativa no município de Piracema entre os meses de março/2008 e maio/2010.

As análises destes ecótopos, bem como a triagem do material encontrado no seu interior, apresentou uma entomofauna formada por diferentes indivíduos, principalmente pelas ordens Hymenoptera, Coleoptera, Dermaptera, Blattodea e Orthoptera. Outros artrópodos encontrados com freqüência foram: Diplopoda, Chilopoda, Isopoda, Aranae e Acarinae.

Em Bambuí, entre os gambás capturados, em 44% (20/45) foram instalados os carréteis de rastreamento. No restante dos indivíduos, em 18% (8/45) o carretel não foi instalado devido os gambás serem muito novos e pequenos para carregar o equipamento; 16% (7/45) foram fêmeas capturadas com filhotes no marsúpio e 22% (10/45) não foram instalados por razões relacionadas ao tempo disponível para as amostragens. Dos carretéis instalados, 55% (11/20) permitiram seguir o percurso da linha, 15% (3/20) foram dispensados pelos animais no início do trajeto, em 20% (4/20) o percurso da linha foi perdido sem indicação de ecótopos naturais e 10% (2/20) foram mortos e retirados das armadilhas por moradores da região. Através deste equipamento foram identificados 18 ecótopos naturais visitados pelos indivíduos, sendo 7 caracterizados como ninhos (Figura 27).

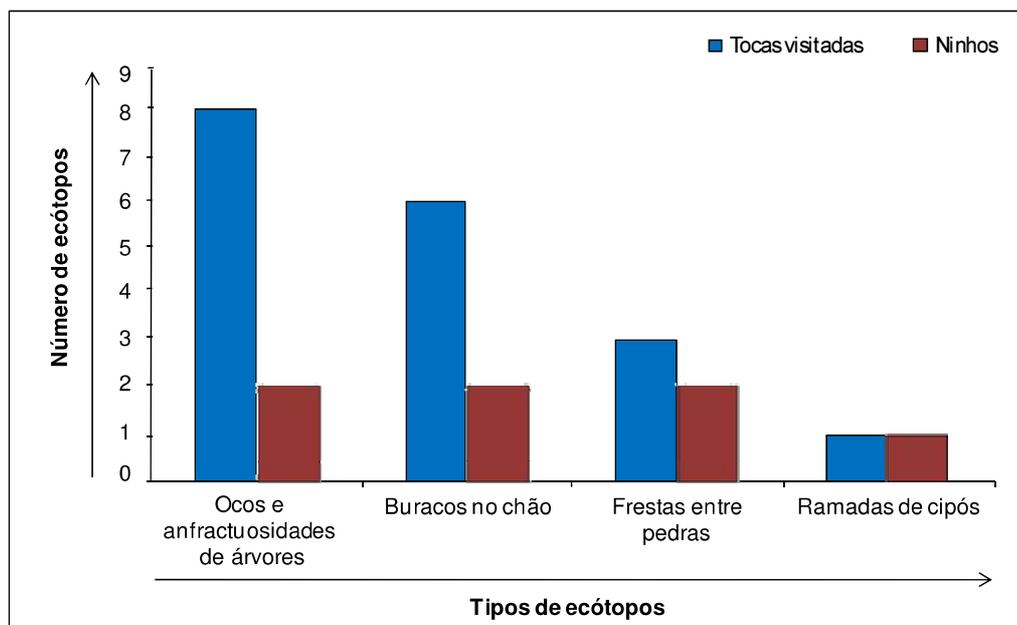


Figura 27 – Número de ecótopos naturais encontrados durante as amostragens de campo, através do uso dos carréteis de rastreamento em *Didelphis albiventris* no município de Bambuí.

No município de Piracema, entre os gambás capturados, em 45% (14/31) foram instalados os carréteis de rastreamento. Nos demais indivíduos, os carréteis não foram instalados por serem fêmeas com filhotes no marsúpio (13% - 4/31) e por razões relacionadas ao tempo disponível para as amostragens (42% - 13/31). Dos carréteis instalados 93% (13/14) permitiram seguir o percurso da linha e 7% (1/14) tiveram a linha perdida no início do percurso. Através do uso dos carréteis foram identificados 16 ecótopos naturais visitados pelos indivíduos, entre eles 3 ninhos (Figura 28).

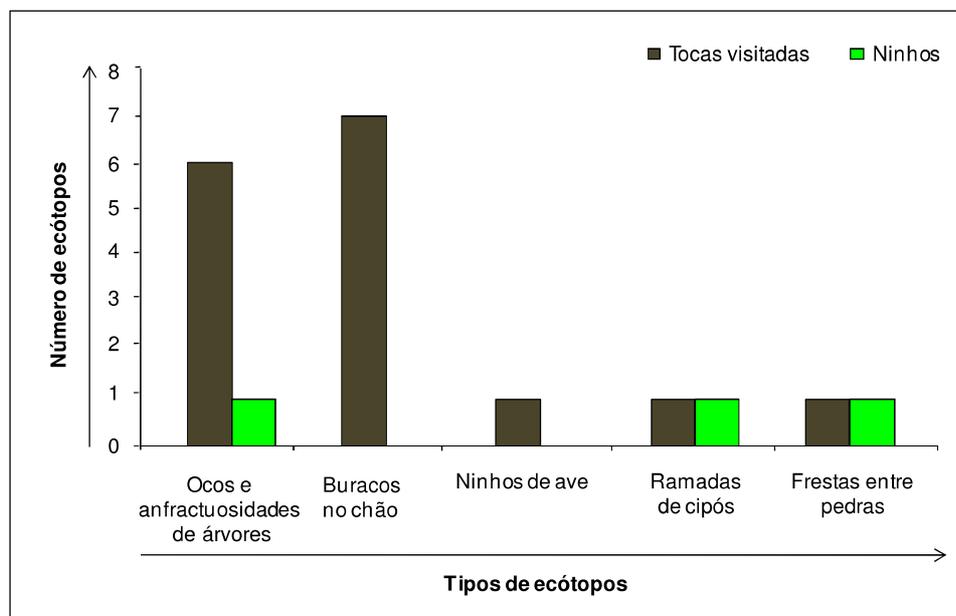


Figura 28 – Número de ecótopos naturais encontrados durante as amostragens de campo, através do uso dos carretéis de rastreamento em *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita* no município de Piracema.

No município de Bambuí a armadilha luminosa foi instalada por três vezes, cada vez em uma localidade diferente (Carapuça, Abacaxis e Posses), e permaneceu ligada por duas noites. No município de Piracema esta armadilha foi instalada nas localidades de Mosquito e Pintos, da mesma forma que no município de Bambuí. Foram encontrados apenas insetos noturnos não relacionados com a subfamília Triatominae.

Além de auxiliar na investigação do ambiente artificial, as armadilhas de Noireau foram instaladas, em algumas oportunidades, nos anexos peridomiciliares. Em Piracema, as armadilhas (com camundongo) foram instaladas em um paiol da localidade de Pintos, onde haviam sido coletadas diversas ninfas de *P. megistus*. Além de paiol, este local também servia de galinheiro e chiqueiro. Foram colocadas dez armadilhas, entretanto não foram detectados triatomíneos. Em Bambuí, estas armadilhas foram instaladas no peridomicílio de uma residência, na localidade de Carapuça, em 4 locais: 1 paiol, 2 caixas de madeiras grandes (com roupas usadas e revistas velhas), 4 pilhas de madeiras e 4 pilhas de lenhas. Nas caixas com roupas e

revistas haviam sido encontrados barbeiros alguns meses antes desta investigação. As armadilhas não indicaram a presença de triatomíneos nestes locais.

Para pesquisa do ambiente natural de Bambuí, foram instaladas as armadilhas de Noireau em sete localidades (Fazenda do Wanda, Caatinga, Cabaças, Cambuí, Capoeirão, Olhos D'água e Tabatinga) em diferentes ecótopos.

A pesquisa nas palmeiras (*Acrocomia aculeata* - macaúbas) oportunizou o encontro de uma ninfa de 4° estágio de *R. neglectus*, na localidade de Caatinga, e de um adulto (♂) e duas ninfas de 3° estágio, na localidade de Capoeirão. Nenhum dos indivíduos apresentou infecção por *T. cruzi*. A exploração do ambiente natural levou ao encontro de uma colônia de ninfas de *P. megistus* em uma árvore viva. O foco foi encontrado na localidade de Olhos D'água durante a amostragem de maio/2010. A colônia estava na árvore *Dimorphandra mollis* Benth, popularmente conhecida como faveira, no interior de um grande oco e numa anfractuosidade da árvore. Foram encontradas 4 ninfas, 2° e 3° ínstar, e 4 ovos eclodidos do barbeiro. As ninfas foram capturadas com auxílio das armadilhas de Noireau (adaptada com galinhas) e os ovos pela triagem do material coletado na árvore. Foram observados no local pequenos lacertídeos, um morcego e muitas fezes de roedores e de gambás (*Didelphis* sp.), indicando seu uso freqüente como refúgios destes animais silvestres (Figura 29). As ninfas tiveram as fezes e a hemolinfa analisadas, com auxílio de microscópio óptico, não demonstrando a presença de *T. cruzi*.



Figura 29 – Foco natural de *Panstrongylus megistus* encontrado no município de Bambuí. **A** - Árvore onde foi encontrada a colônia do barbeiro; **B** - Coleta de material do interior da árvore para triagem; **C** - instalação de armadilhas de Noireau com camundongos e galinhas; **D** - triagem do material; **E** - Captura de ninfa nas armadilhas com galinhas; **F** - Ninfas e ovos encontrados no ecótopo natural.

Para a avaliação dos parâmetros ambientais do ecótopo natural de *P. megistus*, o equipamento HOBO sensor[®] foi instalado por cinco dias dentro do oco da árvore, tendo um equipamento ao lado de fora como referência. A leitura realizada pelo equipamento demonstrou que o abrigo formado pela árvore manteve

a temperatura e a umidade mais constantes no seu interior (Figura 30 A e B). A temperatura no interior da árvore variou entre 8,6°C e 15,6°C, apresentando uma menor oscilação do que o lado externo (mín. 3,7°C e máx. 24°C) do ecótopo. A umidade também apresentou uma menor variação quando comparada ao ambiente externo, no entanto se manteve mais próxima da umidade máxima (TABELA 6).

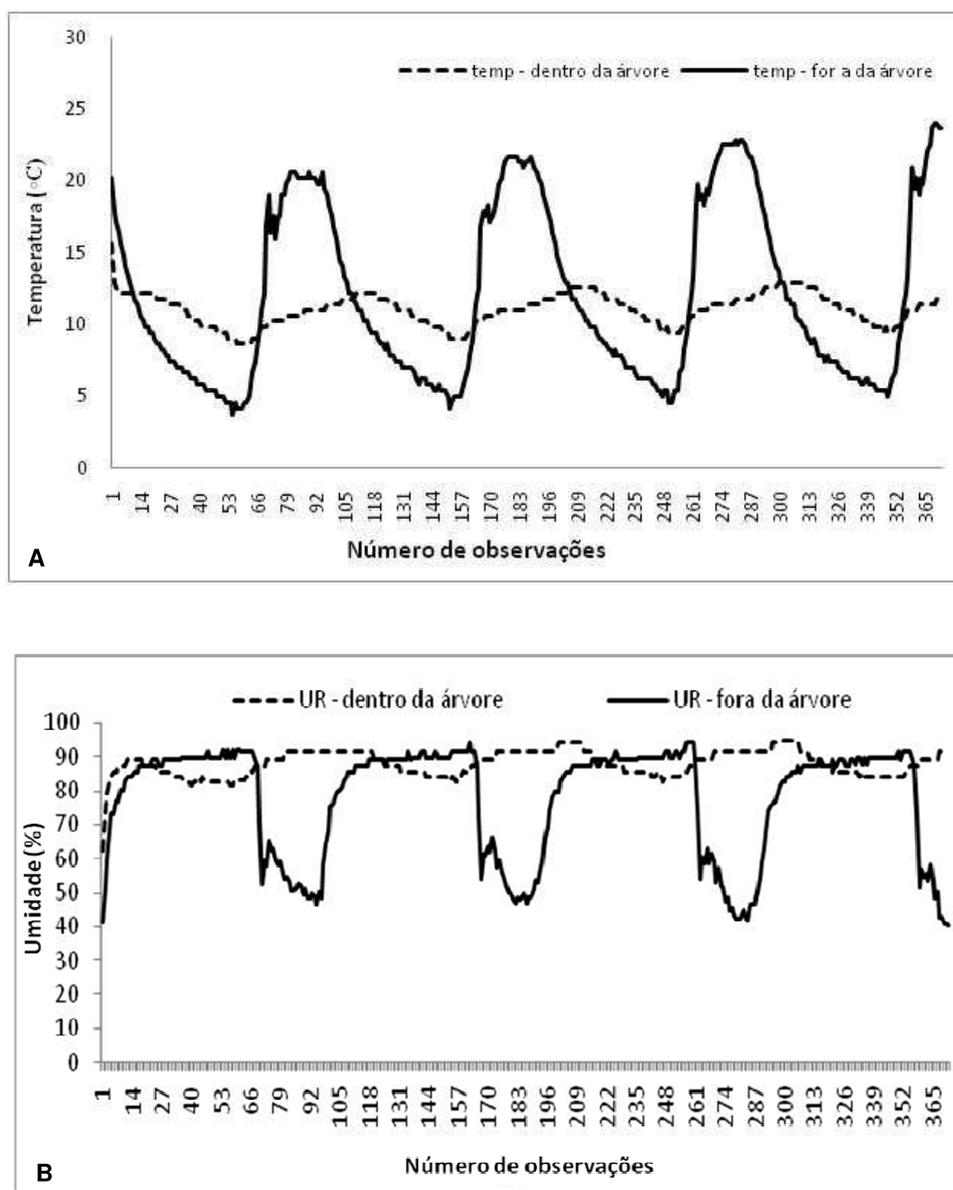


Figura 30 – Variáveis ambientais registradas através do equipamento HOBO sensor[®] no ecótopo natural de *Panstrongylus megistus* (interior da árvore) e no ambiente externo (fora da árvore), durante cinco dias de amostragem (as observações foram realizadas a cada 15 min): **A** - Temperatura; **B** - Umidade.

TABELA 6 - PARÂMETROS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA OBSERVADOS NA PARTE INTERNA E EXTERNA (AMBIENTE) DA ÁRVORE COM COLÔNIAS NATURAIS DE *Panstrongylus megistus*.

Parâmetros	Temperatura (°C)		Umidade Relativa (%)	
	Interna	Externa	Interna	Externa
Média	11.04	11.96	88.04	77.74
Desvio	1.10	6.06	3.81	16.51
Máxima	15.6	24.0	94.6	94.5
Mínima	8.6	3.7	62.3	40.6

5.4 Identificação das diferentes fontes alimentares utilizadas por *Panstrongylus megistus* nos municípios estudados.

No município de Bambuí foram analisados um total de 43 *P. megistus* (6 machos, 17 fêmeas e 20 ninfas) capturados no intradomicílio (20 indivíduos) e peridomicílio (23 indivíduos) de 15 localidades diferentes. Do total de indivíduos analisados, 39% (17/43) não apresentaram reações, sendo que 53% (9/17) destes estavam secos no momento da coleta do material. Entre as amostras reativas (61% - 26/43), 65% (17/26) demonstraram reações únicas, 23% (6/26) reações duplas e 12% (3/26) reações triplas. A reação única mais freqüente foi de aves (10 indivíduos) e a dupla foi de ave/cão (3 indivíduos). Embora as reações triplas tenham apresentado baixa freqüência, demonstraram associações importantes como ave/cão/tatu, em uma ninfa capturada num paiol, e ave/cavalo/gambá, em um barbeiro fêmea encontrado no quarto de dormir. Estas associações sugerem a circulação de *P. megistus* entre os ambientes naturais e artificiais no município de Bambuí. As reações fracas (RF) observadas em algumas amostras podem indicar uma alimentação mais antiga nos hospedeiros, apresentado pouco material para análise, ou uma reação cruzada entre fonte alimentares (TABELA 7).

TABELA 7 - FONTES ALIMENTARES DE *Panstrongylus megistus* OBTIDOS ATRAVÉS DE NOTIFICAÇÕES E ATENDIMENTOS REALIZADOS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.

FONTE ALIMENTAR		INTRADOMICÍLIO			PERIDOMICÍLIO			TOTAL
		Quarto	Sala	Outros	Galinheiro	Paio	Outros	
ÚNICA (65%)	Ave	2♀ 1♂*	-	-	2♀ 2Nf	3 Nf	-	10
	Cão	-	-	-	-	3 Nf++	-	3
	Humano	1♂ 2Nf	-	-	1 Nf	-	-	4
	Ave/cão	1 Nf*	-	-	-	2 Nf++	-	3
DUPLA (23%)	Ave /roedor	-	1 (♂)+	-	-	-	-	1
	Ave/gato	-	1♀	-	-	-	-	1
	Cão/tatu	-	-	1 (♀)***	-	-	-	1
TRIPLA (12%)	Ave/cão/tatu	-	-	-	-	1 Nf*++	-	1
	Ave/cão/roedor	-	-	-	-	1♂	-	1
	Ave/cavalo/gambá	1 (♀)**	-	-	-	-	-	1
TOTAL DE REAÇÕES		8	2	1	5	10	0	26
NÃO REAGIRAM		7	2	-	-	7++	1	17
TOTAL DE INDIVÍDUOS		15	4	1	5	17	1	43

Nf=ninfa; RF=reação fraca; * RF para ave; **RF para cavalo; *** RF para tatu; +casa desabitada; ++ paio com galinhas.

Avaliando o número de hospedeiros presentes nas amostras, observamos que a maior ocorrência foi de aves (49% - 18/37), cães (22% - 8/37), humanos (11% - 4/37), roedores (5% - 2/37), tatus (5% - 2/37), cavalo (3% - 1/37), gambá (3% - 1/37) e gato (3% - 1/37). Considerando a captura dos barbeiros nos diferentes ambientes, foi observado que as aves foram os hospedeiros que ocorreram com maior frequência, tanto no intradomicílio (44% - 7/16) como no peridomicílio (52% - 11/21). No intradomicílio a segunda fonte alimentar mais utilizada foi humanos (19% - 3/16), seguido de cães (13% - 2/16) e de animais comuns neste ambiente, como roedores e gatos (ambos com 6% - 1/16), e outros mais inusitados, como cavalo e gambá (6% cada). No peridomicílio o segundo hospedeiro mais utilizado pelos barbeiros foram os cães (33% - 7/21), seguido de roedor, tatu e, até mesmo, o homem (todos com 5% - 1/21) (Figura 31). Nenhum dos barbeiros analisados para fonte alimentar apresentou infecção para *T. cruzi*.

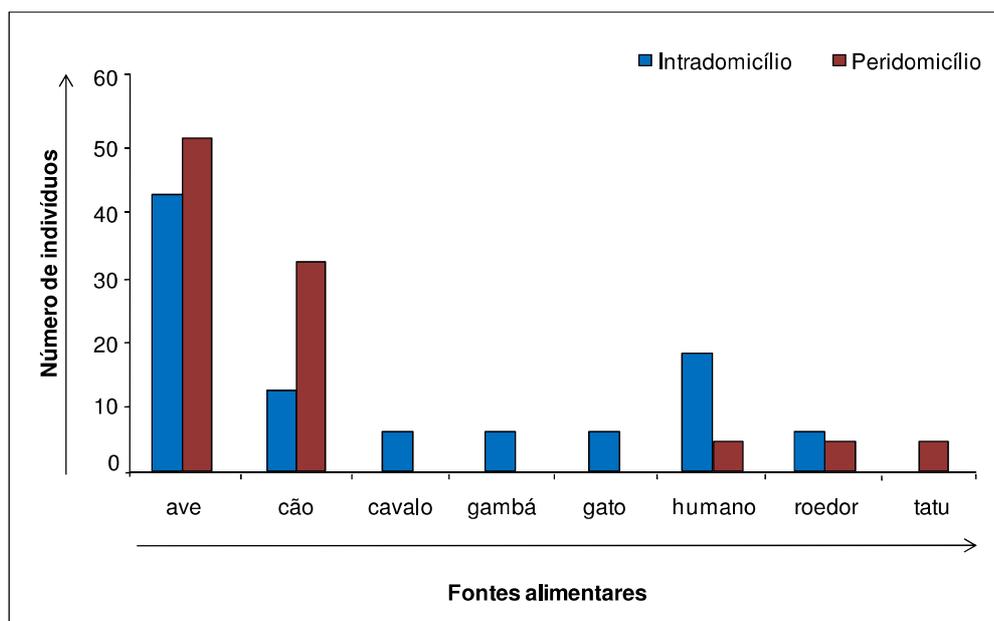


Figura 31 – Ocorrência de hospedeiros presentes na análise de fonte alimentar realizada em *Panstrongylus megistus* obtidos através de notificações e atendimentos realizados no ambiente doméstico do município de Bambuí.

Em Piracema, foram analisados 7 indivíduos, dos quais 5 não apresentaram reações nas análises realizadas. Dos indivíduos que foram reativos (ambos encontrados no ambiente peridomiciliar), uma ninfa capturada em uma pilha de lenhas apresentou uma reação dupla para ave/cão e um barbeiro macho, capturado em um galinheiro, demonstrou uma reação simples para ave.

5.5 Determinação da interrelação entre os ambientes domiciliar e silvestre a partir dos índices de infecção por *Trypanosoma cruzi* observados em reservatórios (domésticos e silvestres) e vetores encontrados nos municípios de Bambuí e Piracema

I - Avaliação da infecção por *Trypanosoma cruzi* em *Panstrongylus megistus* coletados em Bambuí e Piracema

No município de Bambuí foram obtidos 361 *P. megistus* (228 de notificações e 133 de atendimentos), entre os anos de 2004 e 2010. Nas notificações, 57% (130/228) dos indivíduos estavam secos no momento da captura e 43% (98/228) foram analisados, onde 7% (7/98) foram positivos para *T. cruzi*. Nos atendimentos, 38% (50/133) estavam secos e 62% (81/133) foram analisados, encontrando-se apenas 1 (1.2%) indivíduo positivo para o parasito. Os barbeiros infectados foram obtidos em seis localidades diferentes do município, variando o índice de infecção de 0% a 12% entre os anos de 2004 e 2010. O número de casas com *P. megistus* infectados manteve-se abaixo de 5% das casas infestadas, exceto no ano de 2005 (12%) (Figura 32).

No município de Piracema foram obtidos 462 barbeiros, 297 de notificações e 165 de atendimentos (2004 a 2010). Entre as notificados, 43% (128/297) estavam secos, 57% (169/297) foram analisados e 14% (23/169) estavam positivos para *T. cruzi*. Entre barbeiros capturados nos atendimentos, 11% (18/165) estavam secos, 89% (147/165) foram analisados e 9% (13/147) foram positivos para *T. cruzi*. Os barbeiros infectados foram encontrados em 17 localidades com um índice de infecção entre 2% e 29,4%. As casas com *P. megistus* infectados foram mais freqüentes que em Bambuí, principalmente em 2005 (18%) e 2008 (17%) (Figura 32).

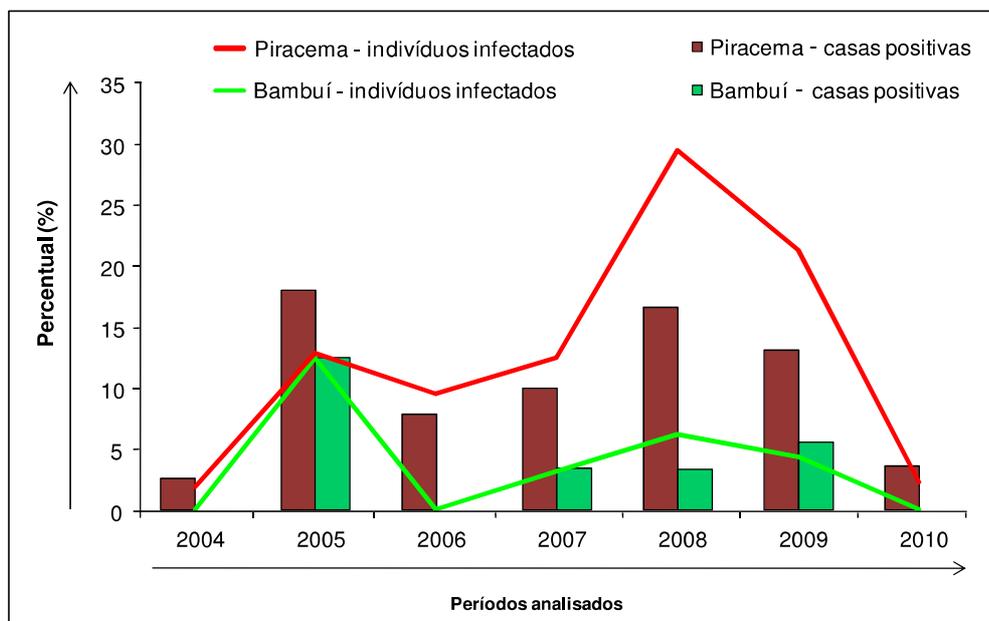


Figura 32 – Casas com presença de *Panstrongylus megistus* infectados por *Trypanosoma cruzi* (casas positivas) e índice de infecção dos barbeiros nos municípios de Bambuí e Piracema entre os anos de 2004 a 2010 (Fonte: Programa de Controle da Doença de Chagas).

A caracterização molecular foi realizada nos barbeiros obtidos entre 2008 e 2010. Em Bambuí as coletas permitiram o encontro de 163 indivíduos, sendo que 66% (107/163) foram analisados e 10% (16/163) estavam infectados. Em Piracema, foram recebidos 189 indivíduos, sendo que 48% (91/189) foram analisados e 2% (4/189) estavam infectados.

II – Análises sorológicas e moleculares realizadas nos diferentes reservatórios capturados nas áreas de estudo.

A) Animais domésticos

No município de Bambuí foram amostrados 236 cães domésticos (173 machos e 63 fêmeas) em diferentes faixas-etárias de 54 localidades. Entre as localidades amostradas, 47 (87%) foram na zona rural (amostrados 207 cães - 88%) e 7 (13%) localidades (amostrados 29 cães - 12%) nas regiões urbana e periurbana. O predomínio das amostras foi de cães adultos (165 - 70%), seguido de cães jovens

(43 - 18%) e idosos (28 - 12%). No município de Piracema, foram amostrados 251 cães (186 machos e 65 fêmeas) de diferentes idades em 45 localidades. Entre as localidades amostradas 43 (95%) foram na zona rural (246 cães - 98%) e 2 (5%) localidades (5 cães - 2%) na região urbana e periurbana. A distribuição das faixas-etárias nas amostras foi semelhante ao município de Bambuí, onde a maior parte das coletas foi realizada em cães adultos (129 - 51%), seguido de cães jovens (88 - 35%) e idosos (34 - 14%).

Em alguns cães foi possível somente a coleta de sangue total em papel filtro (29 em Bambuí e 15 em Piracema). Desta forma, nas amostras em papéis filtros destes indivíduos realizou-se apenas os teste de RIFI para doença de Chagas e leishmanioses, os quais foram todos não reativos. Dado que foi realizado apenas um teste sorológico, estes cães não foram comparados com os demais. As demais análises sorológicas (HAI, RIFI, ELISA e *Trypanosoma Detect*[®]) foram realizadas em 207 indivíduos de Bambuí e 236 de Piracema. Em Bambuí, os métodos sorológicos utilizados para a detecção dos anticorpos anti-*T. cruzi*, indicaram diferentes índices de positividade. O maior número de indivíduos positivos foi obtido a partir do HAI (6% - 12/207), seguido do *Trypanosoma Detect*[®] (5,3% - 11/207) e RIFI (3,4% - 7/207) (TABELA 8). Os dados sobre as capturas de cães estão detalhadas (Anexo 8.2).

TABELA 8 - ANÁLISES SOROLÓGICAS, PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES REALIZADAS NOS CÃES AMOSTRADOS NAS ZONAS URBANAS E RURAIS DO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.

CÃES ANALISADOS – AMOSTRAS DE SORO								
Idade*		Jovens		Adultos		Idosos		Total
Total		37		145		25		207
INDIVÍDUOS COM SOROLOGIA REAGENTE								
Idade*		Jovens		Adultos		Idosos		Total
SOROLOGIA	Teste	Reag.	Indeter.	Reag.	Indeter.	Reag.	Indeter.	
	<i>Trypanosoma Detect</i> TM	2	---	8	---	1	---	11
	HAI – DCh	2	---	9	---	1	---	12
	RIF - DCh	2	1	4	4	1	---	7
	Reagente em 2 ou mais testes - Dch	1	--	4	--	1	---	6
	ELISA Leish	5	3	38	21	5	---	48
	RIFI Leish	10	---	28	4	1	---	39
	Reagentes para ELISA e RIFI	2	--	10	--	0	---	12
REAÇÃO CRUZADA	Reagentes para DCh e Leish	0	--	1	--	0	--	1

ANÁLISES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES								
Idade*		Jovens		Adultos		Idosos		Infecção <i>T. cruzi</i>
PARASITOLÓGICOS	Hemocultura (n=22)	3		11		7		Negativa
	Xenodiagnóstico (n=18)	2		14		2		Negativa
MOLECULAR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR) (n=92)	16		69		7		Negativa

* Idade dos cães: jovens= 0 a 2 anos, adultos = 2 a 6 e idosos = mais de 6 anos, DCh = Doença de Chagas, LEISH = Leishmaniose, Reag. = reagente, indeter. = indeterminados.

Em Piracema, foi encontrada uma maior positividade no teste *Trypanosoma* Detect[®] (12,3% - 29/236), seguido do HAI (3,4% - 8/236) e RIFI (3% - 78/236). Considerando como reativos para *T. cruzi*, animais com pelo menos dois dos três testes sorológicos realizados positivos, foram encontrados 6 (3%) cães em Bambuí e 10 (4,2%) cães de Piracema. As análises sorológicas para *Leishmania* sp., considerando positivos os cães com reatividade nos dois testes aplicados, indicaram 6% (12/207) em Bambuí e 2,5% (6/236) em Piracema (TABELA 9). Os dados sobre as capturas de cães estão detalhadas na (Anexo 8.3).

Buscando prováveis reações cruzadas entre a doença de Chagas e leishmanioses, foi observado que em Bambuí apenas um cão foi considerado positivo para a doença de Chagas e Leishmanioses (dois testes positivos para cada enfermidade). Em Piracema não foi encontrado nenhum cão com as duas reações positivas. Os exames parasitológicos (xenodiagnóstico e hemocultura) realizados nos cães foram negativos para presença de *T. cruzi*. As análises por PCR-Multiplex para *T. cruzi* também não identificaram a presença do parasito nas amostras de sangue coletadas.

TABELA 9 – ANÁLISES SOROLÓGICAS, PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES REALIZADAS NOS CÃES AMOSTRADOS NAS ZONAS URBANAS E RURAIS DO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.

CÃES ANALISADOS – AMOSTRAS DE SORO								
Idade*		Jovens		Adultos		Idosos		Total
Total		81		122		33		236
INDIVÍDUOS COM SOROLOGIA REAGENTE								
Idade*		Jovens		Adultos		Idosos		Total
SOROLOGIA	Resultado teste	Reag.	Indeter.	Reag.	Indeter.	Reag.	Indeter.	
	<i>Trypanosoma</i> Detect™	6	---	20	---	3	---	29
	HAI - DCh	1	---	7	1	0	---	8
	RIF - DCh	2	1	5	---	0	---	7
	Reagente em 2 ou mais testes - Dch	0	--	10	---	0	--	10
	ELISA Leish	12	7	16	14	4	4	32
	RIFI Leish	20	---	18	3	0	---	38
	Reagentes para ELISA e RIFI	3	--	3	---	0	--	6
REAÇÃO CRUZADA	Reagentes para DCh e Leish	0	--	0	---	0	--	0
ANÁLISES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES								
Idade*		Jovens		Adultos		Idosos		Infecção <i>T. cruzi</i>
PARASITOLÓGICOS	Hemocultura (n=11)	4		6		1		Negativo
	Xenodiagnóstico (n=10)	3		5		2		Negativo
MOLECULAR	<i>Polimerase Chain Reaction (PCR)</i> (n=113)	38		64		11		Negativo

* Idade dos cães: jovens= 0 a 2 anos, adultos = 2 a 6 e idosos = mais de 6 anos, DCh = doença de Chagas, Leish = leishmaniose, Reag. = reagente, indeter = indeterminados.

Em Bambuí, a análise molecular para *T. cruzi* (PCR-Multiplex) foi realizada em amostras de todos 34 gatos amostrados. Quando era possível a manipulação do animal, foram realizados xenodiagnósticos (11 amostras), entretanto nenhum resultou positivo para o parasito (TABELA 10). Em Piracema, a análise molecular foi realizada nos 25 gatos amostrados e o xenodiagnóstico, nas mesmas condições que em Bambuí, foi realizado em 5 indivíduos (TABELA 11). Não foram realizadas hemoculturas nestes animais.

TABELA 10 – ANÁLISES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES REALIZADAS EM GATOS DOMÉSTICOS CAPTURADOS EM DIFERENTES LOCALIDADES DO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.

LOCALIDADES	INDIVÍDUOS			ANÁLISES REALIZADAS		Infecção <i>T. cruzi</i>
	MACHOS	FÊMEAS	TOTAL	XENODIAGNÓSTICO	PCR- <i>T. cruzi</i>	
Abacaxi	1	0	1	1	1	Negativa
Araras II	1	0	1	1	1	Negativa
Barra do Sambura	1	0	1	0	1	Negativa
Cabaças	1	0	1	1	1	Negativa
Capoeira	1	1	2	0	2	Negativa
Capoeirão	2	0	2	0	2	Negativa
Coqueiros	4	0	4	3	4	Negativa
Lagoa do Junco	1	0	1	0	1	Negativa
Luzia	3	0	3	0	3	Negativa
Morro Branco	1	0	1	0	1	Negativa
Olhos D'água	1	1	2	1	2	Negativa
Pau-Ferro	4	2	6	4	6	Negativa
Ponte Alta	1	0	1	0	1	Negativa
Potreiro	1	0	1	0	1	Negativa
Sertãozinho I	2	2	4	0	4	Negativa
Sertãozinho II	0	1	1	0	1	Negativa
Turvo	1	1	2	0	2	Negativa
TOTAL	26	8	34	11	34	---

TABELA 11 - TESTES PARASITOLÓGICOS E MOLECULARES REALIZADOS EM GATOS AMOSTRADOS NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.

LOCALIDADE	INDIVÍDUOS			ANÁLISES REALIZADAS		Infecção <i>T. cruzi</i>
	Machos	Fêmeas	Total	Xenodiagnóstico	PCR- <i>T. cruzi</i>	
Colônia	2	1	3	0	3	Negativa
Condé	1	2	3	0	3	Negativa
Limeira	1	0	1	0	1	Negativa
Mosquito	0	1	1	0	1	Negativa
Paracatú	1	0	1	1	1	Negativa
Perobas de Cima	1	0	1	0	1	Negativa
Perobas do Meio	1	1	2	0	2	Negativa
Pintos	5	5	10	3	10	Negativa
Sobradão	1	2	3	1	3	Negativa
Total	13	12	25	5	25	---

B) Animais capturados no peridomicílio e ambiente silvestre.

- Caracterização dos marsupiais e roedores capturados no município de Bambuí.

No município de Bambuí foram realizadas capturas de roedores (domésticos, e silvestres) e marsupiais em 16 localidades, somando um total de 993 armadilhas instaladas (17 armadilhas/noite). No ambiente silvestre foram colocadas 723 armadilhas (21 armadilhas/noite), com um índice de captura de 9,5%. No ambiente peridomiciliar foram instaladas 270 armadilhas (12 armadilhas/noite), com um índice de captura de 7%. No total foram capturados 45 gambás, 12 cuícas e 26 roedores. Foram capturadas duas espécies de marsupiais: *Micoureus* sp. (cuíca) e *D. albiventris* (gambá-de-orelha-branca). As cuícas foram capturadas nas localidades de Cambuí e Olhos D'água. Não foi registrado o encontro de *Micoureus* sp. em outros locais do município, bem como relato dos moradores de sua presença no ambiente domiciliar. Os gambás, ao contrário das cuícas, foram capturados com mais frequência, sendo encontrados em 11 das 16 localidades trabalhadas (TABELA 12).

TABELA 12 - NÚMERO DE ARMADILHAS INSTALADAS POR LOCALIDADES NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ E NÚMERO DE INDIVÍDUOS CAPTURADOS.

Localidades	ARMADILHAS			CAPTURAS**			
	Peri	Silvestre	Total	Gambás	Cuicas	Roedores	Total
Abacaxis	28	26	54	1	0	3	4
Algodão	13	0	13	0	0	0	0
Araras II	23	87	110	6	0	5	11
Caatinga	6	13	19	1	0	0	1
Cabaças	0	11	11	2	0	0	2
Cambuí	2	176	178	1	5	5	11
Capoeira	0	0	0	1*	0	0	1
Capão	0	17	17	0	0	0	0
Carapuça	28	19	47	4	0	3	7
Faz. do Wanda	0	8	8	0	0	0	0
Gameleira	12	0	12	0	0	0	0
Olhos D`água	72	92	164	5	7	7	19
Gordura	12	0	12	3	0	0	3
Pau-Ferro	0	108	108	0	0	0	0
Posses	20	88	108	14	0	2	16
Tabatinga	54	78	132	7	0	1	8
Total	270	723	993	45	12	26	83

* Capturado manualmente no seu ninho; ** Não foi considerada a captura do morcego.

As espécies de roedores domésticos capturados, *Mus musculus* e *Rattus rattus*, foram freqüentemente encontradas nos anexos peridomiciliares, associadas à locais de armazenamento de sementes como arroz e milho (paiós, caixas de madeira, etc.) e abrigos com diferentes tipos de entulhos (lenha, caixas com roupas velhas, utensílios caseiros em desuso, etc.). Na localidade de Olhos D`água, no entanto, foi capturado um *M. musculus* no interior de um fragmento de mata aproximadamente 340 m de distância da casa mais próxima. A espécie *Nectomys* sp. foi capturada sempre próxima à pequenos cursos de água (córregos) no ambiente natural, normalmente fora da área de uso doméstico humano. As espécies *Oligoryzomys* sp. e *Oecomys* sp. foram capturados apenas no ambiente natural. Quatro roedores capturados no ambiente silvestre não foram identificados. Os gambás foram capturados tanto nos ambientes peridomiciliares (29%) como nos silvestres (71%) em diferentes localidades, sendo encontrados gambás positivos para *T. cruzi* em ambos ambientes (TABELA 13).

TABELA 13 - NÚMERO DE ESPÉCIES CAPTURADAS NOS AMBIENTES PERIDOMICILIAR E SILVESTRE NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.

Indivíduos	Espécies	Capturas	Sexo		Ambiente*		
			M	F	Peridomicílio	Silvestre	
Gambás	<i>Didelphis albiventris</i>	45	18	27	2/13	5/32	
Cuícas	<i>Micoreus</i> sp.	12	6	6	0/0	0/12	
Morcego	Não identificado	1	1	0	0/0	0/1	
Roedores	silvestres	<i>Não identificado</i>	3	2	1	0/0	0/3
		<i>Oecomys</i> sp.	2	0	2	0/0	0/2
		<i>Oligoryzomys</i> sp.	2	1	1	0/0	0/2
		<i>Nectomys</i> sp.	12	7	5	0/0	0/12
	Peridomicílio	<i>Rattus rattus</i>	1	1	0	0/1	0/0
		<i>Mus musculus</i>	6	3	3	0/5	0/1
	TOTAL		84	39	45	2/19	5/65

* Infectados/capturados

Nos roedores, cuícas e morcegos (total de 39 indivíduos) capturados foram realizados 9 hemoculturas, 38 xenodiagnósticos e 39 PCR-Multiplex. Os resultados destas análises não demonstraram a participação destes indivíduos nos ciclos de transmissão do *T. cruzi* nas áreas estudadas, uma vez que foram negativos para presença deste parasito (TABELA 14).

TABELA 14 - NÚMERO DE ESPÉCIES CAPTURADAS E INFECTADAS POR *Trypanosoma cruzi* NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.

Índividuos	Espécies	Capturas	XENO *	HEMO**	PCR-Multiplex	Infecção <i>T. cruzi</i>	
Cuícas	<i>Micoreus</i> sp.	12	12	2	12	Negativa	
Morcego	Não identificado	1	0	0	1	Negativa	
Roedores	silvestres	Não identificado	3	3	0	3	Negativa
		<i>Oecomys</i> sp.	2	2	0	2	Negativa
		<i>Oligoryzomys</i> sp.	2	2	0	2	Negativa
		<i>Nectomys</i> sp.	12	12	4	12	Negativa
	Peridomicílio	<i>Rattus rattus</i>	1	1	0	1	Negativa
		<i>Mus musculus</i>	6	6	3	6	Negativa
TOTAL		39	38	9	39	---	

*Xenodiagnóstico; **Hemocultura

Dos 45 gambás analisados, 7 (16%) apresentaram infecção pelo *T. cruzi*, sendo representado na grande maioria por fêmeas (86% - 6/7). Foram analisados 45 xenodiagnósticos, 28 hemoculturas e 45 análises por PCR-Multiplex do sangue total em papel filtro (TABELA 15). Dos gambás capturados, 28 foram analisados pelas três técnicas supracitadas.

TABELA 15 - ANÁLISES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES REALIZADAS EM *Didelphis albiventris* CAPTURADOS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.

Número de indivíduos	HEMO	XENO	PCR – Multiplex sangue*	Infecção <i>T. cruzi</i>
17	NR**	Negativo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Positivo	Positivo	Positivo	TCI
1	Positivo	Negativo	Positivo	TCI
1	Positivo	Positivo	Negativo	TCI
1	Positivo	Negativo	Negativo	TCI
45	28	45	45	---

* Amostras em papel filtro; ** Não realizada.

Embora tenha-se obtido um número reduzido de gambás positivos, a análise através do índice Kappa demonstrou uma concordância substancial (0.75 e 0.79) entre os diferentes testes utilizados (TABELA 16). A caracterização molecular demonstrou apenas a presença de *T. cruzi* I (TCI), grupo do parasito associado ao ambiente silvestre (Figura 33). Não foi observada co-infecção por *T. rangeli* nas amostras analisadas.

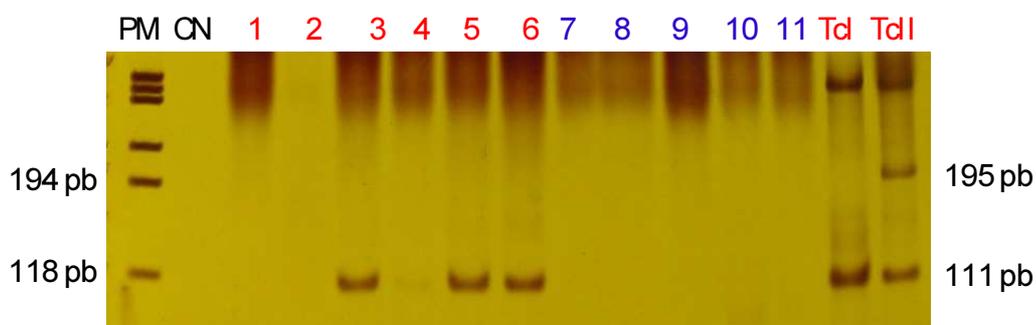


Figura 33 – Perfil de amplificação do DNA satélite de *T. cruzi*, a partir da análise do sangue total de *Didelphis albiventris* capturados no município de Bambuí. PM = Peso molecular Φ X174, CN = controle negativo (sem DNA), 1 a 6 = *D. albiventris* com análises parasitológicas positivas para *T. cruzi* (1 e 2 não detectaram o parasito), 7 a 11 = *D. albiventris* com análises parasitológicas negativas. Controles positivos: TCI = cepa colombiana, TCII = cepa Y.

TABELA 16 - ANÁLISES DE CONCORDÂNCIA ENTRE OS DOIS TESTES PARASITOLÓGICOS REALIZADOS E A ANÁLISE MOLECULAR POR PCR-MULTIPLEX NOS *Didelphis albiventris* CAPTURADOS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.

Xenodiagnóstico			Hemocultura		
PCR-Multiplex	Positivo	Negativo	PCR-Multiplex	Positivo	Negativo
Positivo	4	1	Positivo	5	0
Negativo	1	22	Negativo	2	21
TOTAL	5	23	TOTAL	7	21
Índice Kappa = 0.75			Índice Kappa = 0.79		

Xenodiagnóstico			Gambás		
HEMOCULTURA	Positivo	Negativo	PCR-Multiplex	Positivo	Negativo
Positivo	5	2	Positivo	5	0
Negativo	0	21	Negativo	2	21
TOTAL	5	23	TOTAL	7	21
Índice Kappa = 0.75			Índice Kappa = 0.75		

As capturas dos animais silvestres e domésticos variaram ao longo das estações do ano. A estação de outono apresentou o maior índice de captura de indivíduos (11%), seguido do verão (9%) (TABELA 17).

TABELA 17 - ÍNDICES DE CAPTURAS REALIZADAS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

Estações de coleta	Gambás	Cuícas	Roedores	Total	Armadilhas/noite	Índice de captura
Verão	25	0	3	28	14	9%
Outono	10	12	15	37	31	11%
Inverno	2	0	3	5	17	4%
Primavera	8	0	5	13	29	6%
TOTAL	45	12	26	83	17	8%

Nos gambás capturados foram encontradas as sete classes de idade determinada por erupção e desgaste dentário, que representam as diferentes fases da vida destes indivíduos. Os gambás jovens (classes I, II e III) foram observados apenas nas coletas correspondentes a estação verão, representando 64% (18/28) da amostra. Nas estações de outono, inverno e primavera foi observado somente indivíduos pré-adultos (classe IV) e adultos (classe V – VII). A infecção por *T. cruzi* foi observada apenas em indivíduos com maior tempo de vida como adultos da classe V e VII, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre o número de indivíduos infectados ao longo das estações do ano (TABELA 18).

TABELA 18 - CARACTERIZAÇÃO DAS CAPTURAS DE MARSUPIAIS E ROEDORES AO LONGO DAS ESTAÇÕES DO ANO, INDICANDO O NÚMERO DE ANIMAIS INFECTADOS POR *Trypanosoma cruzi* NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ.

Estações de coleta	Idade de <i>Didelphis albiventris</i> *							Gambás*	Cuícas	Roedores	Total de capturas
	I	II	III	IV	V	VI	VII				
Verão	0/14	0/3	0/1	0/1	2/5	0/1	0	2/25	0	3	28
Outono	0	0	0	0/4	3/5	0/1	0	3/10	12	15	37
Inverno	0	0	0	0/1	0	0/1	0	0/2	0	3	5
Primavera	0	0	0	0	1/6	0/1	1/1	2/8	0	5	13
TOTAL	0/14	0/3	0/1	0/6	6/16	0/4	1/1	7/45	12	26	85

* Total de infectados/coletados

Ao longo das amostragens foram encontradas 6 fêmeas de *D. albiventris* com filhotes no marsúpio (Figura 34). As capturas ocorreram durante a estação da primavera (entre outubro e novembro) e as fêmeas com filhotes corresponderam à 86% (6/7) das fêmeas capturadas na primavera. O número de filhotes encontrado na primavera variou de 4 a 11 indivíduos e o tamanho médio cabeça-corpo foi de 4,73 ($\pm 0,69$) cm. No verão foi capturada uma fêmea com quatro filhotes no marsúpio (média cabeça-corpo = 10,3 cm) (TABELA 19).



Figura 34 – Filhotes (entre 60 e 70 dias de vida) encontrados no marsúpio de *Didelphis albiventris* capturada durante o verão no município de Bambuí.

TABELA 19 – NÚMERO DE FILHOTES DE *Didelphis albiventris* ENCONTRADOS COM AS FÊMEAS NO MUNICÍPIO DE BAMBUÍ NAS ESTAÇÕES DE PRIMAVERA E VERÃO.

Estação	Mês	Nº de filhotes	Cabeça + corpo (cm)	Idade* (dias)
Verão	Fevereiro	4	10.3	60-70
Primavera	Outubro/ Novembro	8	4.9	30-35
		11	4.2	25-30
		7	5.2	30
		8	5.2	30
		6	5.3	35
		8	3.6	20-25
Média (desvio) - Primavera		8(±1.5)	4.73 (±0.69)	30-35

- Caracterização dos marsupiais e roedores capturados no município de Piracema.

No município de Piracema foram realizadas capturas de roedores (domésticos e silvestres) e marsupiais em três localidades, somando um total de 467 armadilhas instaladas (12 armadilhas/noite). No ambiente silvestre foram colocadas 400 armadilhas (16 armadilhas/noite), com um índice de captura de 10%. No ambiente peridomiciliar foram instaladas 67 armadilhas (6 armadilhas/noite), com um índice de captura de 6%. No total foram capturados 31 gambás, 3 cuícas e 11 roedores. Foram capturadas três espécies de marsupiais: *D. albiventris* (gambá-de-orelha-branca), *D. aurita* (gambá-de-orelha-preta) e *Marmosops* sp. (cuíca). As cuícas foram capturadas em duas localidades, em fragmentos de matas próximos às residências (~ 300 m), no entanto fora da área de uso humano. Ao contrário das cuícas, as duas espécies de gambás foram mais comumente capturadas, sendo encontradas em simpatria nas três localidades avaliadas. Entre as áreas trabalhadas, a localidade de Mosquito não apresentou nenhum indivíduo infectado por *T. cruzi* (TABELA 20).

TABELA 20 - NÚMERO DE ARMADILHAS INSTALADAS E INDIVÍDUOS CAPTURADOS POR LOCALIDADE NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.

Localidades	Armadilhas			Capturas				
	Peri	Silvestre	Total	<i>D. albiventris</i> *	<i>D. aurita</i> *	Cuícas	Roedores	Total
Castro	0	0	0	0	1**	0	0	1
Centro	0	0	0	0	1**	0	0	1
Mosquito	4	156	160	0/3	0/3	2	7	15
Pintos	41	190	231	4/5	0/12	1	3	21
Sobradão	22	54	76	1/2	1/4	0	1	7
Total	67	400	467	5/10	1/21	3	11	45

* Infectados/capturados; ** capturados manualmente no peridomicílio.

A espécie *R. rattus* foi capturada no ambiente peridomiciliar de diferentes residências, associada freqüentemente à locais de armazenamento de sementes ou cobertas com materiais em desuso (madeiras, telhas, etc.). A espécie *Oligoryzomys* sp. e os roedores silvestres não identificados foram capturados apenas no ambiente natural. Como observado no município de Bambuí, em Piracema também não foram encontrados roedores silvestres no ambiente peridomiciliar. As duas espécies de gambás foram encontradas principalmente no ambiente natural, entretanto em duas oportunidades foi possível capturar manualmente o gambá *D. aurita* no ambiente peridomiciliar. Ambas espécies apresentaram infecção por *T. cruzi* (TABELA 21).

TABELA 21 - ESPÉCIES CAPTURADAS NO AMBIENTE PERIDOMICILIAR E SILVESTRE NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.

Indivíduos		Espécies	Sexo		Ambiente*		Capturas
			M	F	Peridomiciliar	Silvestre	
Gambás		<i>Didelphis albiventris</i>	5	5	0	5/10	10
		<i>Didelphis aurita</i>	9	12	0/2	1/19	21
Cuícas		<i>Marmosops</i> sp.	1	2	0	0/3	3
		<i>Não identificado</i>	3	1	0/0	0/4	4
Roedores	Silvestre	<i>Oligoryzomys</i> sp.	1	2	0/0	0/3	3
	Peridomicílio	<i>Rattus rattus</i>	2	2	0/4	0/0	4
TOTAL			21	24	0/6	6/39	45

*Total de infectadas/analizadas

A partir dos exames parasitológicos utilizados para determinação da presença de *T. cruzi* nos indivíduos capturados no município de Piracema, foi possível identificar a infecção apenas nos marsupiais *Didelphis* sp. Nos roedores e cuícas capturados foram realizados 14 xenodiagnósticos e 14 PCR-Multiplex, não sendo detectado o *T. cruzi*. Não foram realizadas hemoculturas nestes indivíduos (TABELA 22).

TABELA 22 - NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS PARA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* ATRAVÉS DOS TESTES DE XENODIAGNÓSTICO E HEMOCULTURA NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.

Indivíduos	Espécies	Capturas	XENO *	HEMO**	PCR-Multiplex	Infecção <i>T. cruzi</i>	
Cuícas	<i>Marmosops</i> sp.	3	3	0	3	Negativo	
Roedores	silvestres	<i>Não identificado</i>	4	4	0	4	Negativo
		<i>Oligoryzomys</i> sp.	3	3	0	3	Negativo
	Peridomicílio	<i>Rattus rattus</i>	4	4	0	4	Negativo
Total		14	14	0	14	---	

*Xenodiagnóstico, **Hemocultura.

Dos 31 gambás analisados, 6 (19%) apresentaram infecção pelo *T. cruzi*. A presença do parasito foi maior na espécie *D. albiventris* (50% - 5/10), do que em *D. aurita* (5% - 1/21). Como observado no município de Bambuí, a maior parte dos indivíduos infectados foi fêmeas (67% - 4/6). Foram analisados 30 xenodiagnósticos, 23 hemoculturas e 31 PCR-Multiplex. Entre os gambás capturados, 4 *D. albiventris* e 18 *D. aurita* foram analisados pelas três técnicas empregadas (TABELA 23).

TABELA 23 - ANÁLISES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES (PCR-MULTIPLEX) REALIZADAS EM GAMBÁS *Didelphis albiventris* E *Didelphis aurita* NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.

<i>Didelphis albiventris</i>			
Indivíduos (N=10)	HEMO	XENO	PCR – Multiplex
2	Positivo	Positivo	TCI
1	Positivo	Negativo	TCI
2	NR	Positivo	TCI
3	NR	Negativo	Negativo
1	Negativo	Negativo	Negativo
1	Negativo	NR	Negativo

<i>Didelphis aurita</i>			
Indivíduos (N=21)	HEMO	XENO	PCR – Multiplex
1	NR	Positivo	TCI
2	NR	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	Negativo

* NR = Não realizado

Dada a ausência de hemoculturas em parte dos gambás infectados, as análises de concordância foram realizadas entre o resultado das análises parasitológicas dos animais (com pelo menos um teste positivo) e a PCR-Multiplex. Para um maior número amostral as duas espécies foram analisadas em conjunto, levando a um índice Kappa de 0.89 (quase perfeito) (TABELA 24).

TABELA 24 - ANÁLISES DE CONCORDÂNCIA ENTRE A PCR-MULTIPLEX E OS GAMBÁS (*Didelphis albiventris* E *Didelphis aurita*), CAPTURADOS NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.

PCR-Multiplex	Gambás (<i>D. albiventris</i> e <i>D. aurita</i>)	
	POSITIVO *	NEGATIVO
POSITIVO	5	0
NEGATIVO	1	25
TOTAL	6	25

Índice Kappa = 0.89 (quase perfeito)

* Xenodiagnóstico e/ou hemocultura positiva.

A caracterização molecular demonstrou apenas a presença de *T. cruzi* I (TCI), associado ao ambiente silvestre (Figura 35). Não foi observada co-infecção por *T. rangeli* nas amostras analisadas.



Figura 35 - Perfil de amplificação do DNA satélite de *T. cruzi*, a partir da análise do sangue total de *Didelphis albiventris* capturados no município de Piracema. PM = Peso molecular Φ X174, CN = controle negativo (sem DNA), 1 a 5 = *D. albiventris* com análises parasitológicas positivas para *T. cruzi*, 6 a 9 = *D. albiventris* com análises parasitológicas negativas. Controles positivos: TCI = cepa colombiana, TCII = cepa Y.

As capturas de marsupiais e roedores variaram ao longo das estações do ano. A estação de inverno apresentou o maior índice de captura total (23%). Entretanto, no outono foi obtida a maior diversidade de espécies, indicada principalmente pelo encontro das cuícas (*Marmosops* sp.). A maior captura de gambás ocorreu na estação do verão (TABELA 25).

TABELA 25 - ÍNDICES DE CAPTURAS DE MARSUPIAIS E ROEDORES NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA AO LONGO DAS ESTAÇÕES DO ANO.

Estações de coleta	Gambás*		Cuícas	Roedores	TOTAL DE CAPTURAS	Armadilhas	Índice de captura
	alb*	aur*					
Verão	2	12	0	1	15	113	13%
Outono	3	4	3	7	17	248	7%
Inverno	3	1	0	3	7	30	23%
Primavera	2	4	0	0	6	76	8%
Total	10	21	3	11	45	467	10%

* alb - *Didelphis albiventris*; aur - *Didelphis aurita*.

Nas capturas de gambás, predominou a presença de indivíduos pré-adultos e adultos. Os únicos espécimes jovens encontrados nas capturas foram de *D. aurita*, capturados principalmente no verão. As duas espécies simpátricas demonstraram índices de infecção diferentes em relação às classes de idade observadas. Entre os indivíduos pré-adultos e adultos capturados, apenas *D. albiventris* apresentou parasitismo por *T. cruzi*. Em *D. aurita* o parasito foi encontrado apenas em um indivíduo (jovem - classe II) (TABELA 26).

TABELA 26 - CARACTERIZAÇÃO DAS CAPTURAS DE RESERVATÓRIOS SINANTRÓPICOS E SILVESTRES AO LONGO DAS ESTAÇÕES DO ANO, INDICANDO O NÚMERO DE ANIMAIS INFECTADOS POR *Trypanosoma cruzi* NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA.

Estações de coleta	Idade de <i>Didelphis albiventris</i> (alb) e <i>Didelphis aurita</i> (aur)*																Total infectados*		Total de capturas
	I		II		III		IV		V		VI		VII		alb	aur			
	alb	aur	alb	aur	alb	aur	alb	aur	alb	aur	alb	aur	alb	aur					
Verão	0	0/6	0	0/2	0	0	0	0/1	1/1	0/2	0/1	0/1	0	0	1/2	0/12	1/14		
Outono	0	0	0	0	0	0	1/1	0/1	2/2	0/3	0	0	0	0	3/3	0/4	3/7		
Inverno	0	0	0	0	0	0	0/2	0	0/1	0/1	0	0	0	0	0/3	0/1	0/4		
Primavera	0	1/1	0	0	0	0	0	0	0/1	0/2	1/1	0/1	0	0	1/2	1/4	2/6		
Total	0	1/7	0	0/2	0	0	1/3	0/2	3/5	0/8	1/2	0/1	0	0	5/10	1/21	4/31		

* infectados/ coletados

Durante as amostragens foram encontradas 4 fêmeas com filhotes no marsúpio (2 *D. albiventris* e 2 *D. aurita*). As capturas ocorreram durante a estação de inverno (fim do mês de agosto) e durante a estação de primavera (início de dezembro). A gambá *D. aurita* com filhotes encontrada no inverno foi a única fêmea capturada nesta estação. As gambás com filhotes da primavera corresponderam a 60% (3/5) do total da amostra da estação. O número de filhotes variou de 6 a 8 indivíduos (TABELA 27).

TABELA 27 - NÚMERO DE FILHOTES DE *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita* ENCONTRADOS COM AS FÊMEAS NO MUNICÍPIO DE PIRACEMA NAS ESTAÇÕES DE INVERNO E PRIMAVERA.

Estação	Mês	Filhotes	Cabeça - Corpo (cm)	Idade (dias)	Espécie
Inverno	Agosto	8	6,0	40*	<i>D. albiventris</i>
		6	3.3	20*	<i>D. albiventris</i>
Primavera	Dezembro	9	2.4	8-14**	<i>D. aurita</i>
		8	6.4	43-49**	<i>D. aurita</i>

*Schweigmann (1994), **Motta (1988)

C) Avaliação da infecção das glândulas paraclocais de *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita* nos municípios de Bambuí e Piracema.

Com o objetivo de detectar em indivíduos infectados pelo *T. cruzi* a presença do parasito na luz das glândulas anais, foi realizada a PCR-Multiplex para 7 amostras de Bambuí e 6 (5 *D. albiventris* e 1 *D. aurita*) de Piracema. Através da análise molecular não foi detectada a presença do parasito nas amostras analisadas.

6 DISCUSSÃO

A história do controle da doença de Chagas no Brasil se inicia no município de Bambuí, mais precisamente no final da década de 40, com a descoberta de 25 casos agudos da doença provenientes do centro-oeste mineiro. Deste total, 20 casos foram provenientes de Bambuí e 5 de cidades próximas. O sinal de Romaña, contribuiu para a detecção da maioria dos pacientes, ocorrendo em 15 destes (Martins *et al.* 1940). Um levantamento triatomínico realizado na época demonstrou *P. megistus* como espécie predominante em 75% das casas infestadas, sendo nas restantes encontrado *T. infestans* (Dias 1982).

Dado o elevado número de casos agudos da doença de Chagas no município, as más condições de moradia e grande infestação domiciliar por barbeiros, em 1943 foi instalado o Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de Chagas (CEPMCh), por determinação do Dr. Henrique Aragão, então diretor do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) no Rio de Janeiro (Dias 1945). Vinculado inicialmente à Divisão de Estudos de Endemias do IOC, o CEPMCh foi organizado e dirigido pelo Dr. Emmanuel Dias até a sua morte em 1962. Embora este Centro tivesse como objetivo inicial estudar a profilaxia da doença de Chagas na região, o CEPMCh passou a desenvolver inúmeros trabalhos relacionados à clínica, epidemiologia, terapêutica e ao controle da transmissão vetorial do *T. cruzi* (Dias 1982).

Na época de instalação do CEPMCh (Atual PAEED), foi observada uma rápida mudança na composição de espécies de triatomíneos domiciliados, quando comparado ao período dos primeiros casos da doença de Chagas no município (Martins *et al.* 1940). Em 1943, a espécie *T. infestans* já ocorria na maioria das casas infestadas, reduzindo consideravelmente a presença de *P. megistus* (encontrado em menos de 20% das moradias). Não somente em Bambuí, na segunda metade da década de 40, *T. infestans* predominava em grande parte dos municípios mineiros. Um levantamento triatomínico em 155 municípios de Minas Gerais entre 1946 e 48 (abrangendo 40% dos municípios da época), demonstrou que 70% das capturas domiciliares foram representadas por *T. infestans*. Considerando a rota de expansão

a partir de São Paulo, observa-se Bambuí situada no limite norte da dispersão da espécie no sudoeste mineiro (Pellegrino 1948, 1950).

Entre 1944 e 1947, o CEPMCh realizou diversas pesquisas no intuito de controlar a infestação doméstica dos triatomíneos. Entre os métodos aplicados, pode-se destacar o uso de lança-chamas (contando com um “carro de bombeiro”, para possíveis imprevistos), gás cianídrico, borrifações de querosene e pó Fly-tox. Somadas a estas atividades, foram realizadas melhorias nas cafuas (rebocamento das paredes com cal, barro e areia) e promovidas mudanças dos hábitos próprios da zona rural, como juntar quinquilharias e criar animais (cães, gatos e galinhas) dentro ou embaixo das casas. Estas atividades contribuíram para a redução do barbeiro no ambiente doméstico, levando ao desaparecimento dos casos agudos da doença de Chagas nas áreas urbana e suburbana de Bambuí em 1944 (Dias 1945, Dias 1982). Após incansáveis pesquisas, Dias & Pellegrino (1948) demonstraram o uso do inseticida Gammexane P. 530 (BHC) na eliminação e contenção das infestações e reinfestações domésticas de triatomíneos, por um período aproximado de 2 meses (tempo de ação residual do produto).

As inúmeras atividades de pesquisa realizadas pelo CEPMCh, serviram de base na formação do Programa de Controle da Doença de Chagas (Moreno & Baracho 2000), o qual obteve alcance nacional a partir da década de 70, coordenado pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM). Considerado o berço do controle vetorial da doença de Chagas, Bambuí foi o primeiro município brasileiro a implantar a VE, iniciada em 1974.

Segundo Dias (1965), o município de Bambuí ficou praticamente livre de triatomíneos (principalmente por *T. infestans*) entre 1957 e 1961, resultante do expurgo geral realizado por iniciativa do Dr. Emmanuel Dias entre 1956 e 1958. A partir do início da década de 60, foi observada a diminuição das populações de *T. infestans* (Dias & Dias 1968), tornando-se esporádicas ao longo do tempo, até sua última notificação entre 1977-78.

Com o controle desta espécie, as populações de *P. megistus* voltaram a colonizar o ambiente domiciliar. Era notado que na maioria das casas com *T. infestans*, não era comum a presença de *P. megistus*, sendo raro o encontro das

duas espécies na mesma residência (<4%). Dias & Dias (1968) consideraram esta característica como uma possível competição biológica entre as espécies, entretanto não observaram esta característica em colônias mantidas em laboratório. Posteriormente, Pereira *et al.* (1995) demonstraram que *T. infestans* apresentava uma maior eficiência na obtenção de alimento, o que lhe conferia vantagem competitiva sobre *P. megistus*.

A presença de *P. megistus* no ambiente natural de Bambuí pode ser caracterizada pelas freqüentes visitas dos insetos adultos nas residências, durante os meses mais quentes do ano, e pela grande dispersão do barbeiro no município (Vilella *et al.* 2005). Ainda em 1960, foi observado um aumento de *P. megistus* no ambiente domiciliar. Inicialmente as capturas foram compostas por adultos, ocorrendo um aumento gradual do encontro de ninfas até 1964, onde os dois estágios estavam equivalentes (Dias & Dias 1968).

Embora predominante nos dados avaliados de 1974, as populações de *P. megistus* já se encontravam em franca redução no final da década de 70, como constatado nos períodos entre 1977-78 e 1979-80. O sucesso do controle vetorial promovido pelo Posto Avançado de Estudos Emmanuel Dias - PAEED (nome conferido ao CEPMCh a partir de 1980) deve-se à grande mobilização social e atividades educativas já realizadas na época. Entre estas atividades foram realizados treinamentos com a população para identificação e notificação de triatomíneos, o que deflagrava uma investigação epidemiológica por agentes de saúde e borrifação das unidades domiciliares com barbeiros (Dias & Garcia 1978). A primeira pesquisa integral realizada no município pela SUCAM (em 1983), demonstrou índices de infestações triatomínicas quatro vezes menores do que os observados no início da VE.

O município de Piracema, ao contrário de Bambuí, inicia sua história de controle da doença de Chagas em 1976, com o Levantamento Triatomínico (LT) realizado pela SUCAM. Os dados avaliados não constataram a presença de *T. infestans* no município, sendo *P. megistus* a única espécie capturada no ambiente doméstico. Pellegrino (1950) num levantamento sobre as espécies triatomínicas de Minas Gerais, indica a captura de um (1) *T. infestans* no município de Itaguara,

limítrofe de Piracema. Com a descentralização do PCDCH, a partir de 1993, surgiram registros esporádicos de *P. diasi* em algumas localidades. Neste município, sempre foram observados baixos índices de infestação, possivelmente associado ao bioma Mata Atlântica onde a maior presença de remanescentes naturais (elevando a umidade relativa) permitiriam uma menor pressão invasiva da espécie (Forattini 1980). A ausência de *T. infestans*, pode ter contribuído para os baixos índices de infestação, dada as grandes colônias domésticas desta espécie, como observado em caso único em Bambuí com a coleta de 8.548 barbeiros em uma cafua (Dias & Zéledón 1955).

Ao contrário de *T. infestans*, restrito ao ambiente domiciliar no Brasil, *P. megistus* mantém uma ampla dispersão na região estudada, compondo 99% das capturas entre 2003 e 2007 nos 54 municípios da 3ª GRS (incluindo Bambuí e Piracema) (Vilella *et al.* 2009). Embora disperso, observa-se uma redução nas infestações domésticas do barbeiro, provavelmente devido as atividades iniciadas pela “*Iniciativa Intergubernamental del Cono Sur – INCOSUR*”, que mesmo focalizadas no controle das populações de *T. infestans*, repercutiram na redução das populações de outros triatomíneos que se aproximavam do ambiente artificial.

A partir de 2004 observa-se, em ambos municípios estudados, uma grande redução da infestação domiciliar, levando a uma estabilidade no número de notificações, representado por pequenas variações ao longo dos anos. Estas notificações foram caracterizadas por um maior encontro de fêmeas no intradomicílio, principalmente no quarto, na sala e menos freqüentemente, na cozinha. Quanto aos atendimentos positivos, foi observado um significativo aumento nas investigações de Bambuí, caracterizado por um maior encontro de ninfas no quarto, nos galinheiros e paióis. Em Piracema, observa-se uma situação reversa, onde os atendimentos positivos têm reduzido, principalmente após 2007, caracterizado pelo encontro cada vez menor de fêmeas e ninfas nos quartos e nos galinheiros. Segundo Silveira (2000) a infestação do ambiente domiciliar por espécies silvestres não é passível de eliminação, dado que estes podem reinvasar e recolonizar residências submetidas a controle químico de forma permanente e intensa.

Silva *et al.* (1999) observaram uma maior detecção de residências infestadas por barbeiros através da VE, notificações e atendimentos, do que por busca sistemática de triatomíneos (rotina). A maior detecção dos focos domésticos ocorreu a partir da notificação pelos moradores, sendo a maioria detectados pelo agente de saúde no momento do atendimento (Vilella *et al.* 2009). Segundo Dias (1991), intervenções verticais realizadas anualmente são onerosas e pouco sensíveis na detecção de triatomíneos, especialmente em casas com baixa densidade de vetores. Desta maneira, uma pesquisa priorizando a investigação em quartos, galinheiros e paióis, ecótopos de principal preferência de *P. megistus* observados neste trabalho, pode otimizar os trabalhos de campo e trazer um controle mais rápido dos focos detectados.

A redução no número de notificações e dispersão do barbeiro observadas em Bambuí, principalmente entre 2004 e 2010, pode ser associada também a uma visível melhoria habitacional encontrada na região. As cafuas, que compunham 60% das residências nos meados das décadas de 40 e 50 (Dias 1945, Dias 1965), praticamente não são encontradas na região. As poucas casas de “pau-a-pique” ainda observadas (agora usando telhas de barro, ao invés de palha), servem principalmente como depósitos de ferramentas e são alvos freqüentes de vistorias dos agentes de saúde e moradores. Apenas duas destas casas são utilizadas como moradias. Acredita-se que o grande êxodo rural também tem contribuído para redução das notificações, dado que as famílias passam a viver cada vez menos nas zonas rurais, o que diminui as chances de encontrar o barbeiro. Dados atuais do IBGE (2010) demonstram uma redução na população rural do município para 17% da população total, quando comparado à década de 80 (25%) e da década de 60 (60%) (Dias 1982).

As variações mensais das formas evolutivas de *P. megistus*, foram caracterizadas por uma predominância de ninfas entre os meses de maio e agosto, seguido de um aumento de adultos a partir do mês de setembro em ambos municípios. Ao contrário de Bambuí, Piracema demonstra ninfas predominantes a partir do mês de janeiro. Os dados observados em Piracema estão de acordo com Dias & Dias (1968), que demonstram períodos bem determinados para a

predominância de ninfas (janeiro a agosto) e adultos (setembro a dezembro). Entre os 369 casos agudos associados à transmissão vetorial em Bambuí, 63% ocorreram entre outubro e março (Dias 2009), período de maior dispersão de insetos adultos, seguido pela maior presença de ninfas nos ecótopos domiciliares, segundo registros do PAEED em Bambuí.

Com o intuito de avaliar a dinâmica das populações de *P. megistus*, análises de morfometria geométrica foram realizadas com barbeiros de ambas áreas de estudo. Dujardin *et al.* (1999) observaram que a perda do dimorfismo sexual está associada, principalmente, à maior densidade populacional das colônias de triatomíneos. O maior número de barbeiros leva ao aumento da competição por alimento, favorecendo indivíduos de menor tamanho. Esta característica pode ser observada na colonização dos barbeiros nos ecótopos artificiais, onde as populações atingem grande número de indivíduos dada a estabilidade do local (abrigo de predadores, maior disponibilidade de alimento, etc). Desta maneira, a presença de dimorfismo sexual em uma população, pode demonstrar ausência desta competição, o que é observado normalmente nos ecótopos naturais, onde as colônias não alcançam grandes populações. Souza *et al.* (2008) avaliando barbeiros silvestres, peri e intradomiciliares verificaram um grande fluxo gênico entre os indivíduos, constatado pela ausência de estruturação das populações e dimorfismo sexual evidente. As populações de Bambuí e Piracema demonstraram características de tamanho e forma semelhantes. Em Piracema, a ausência do dimorfismo sexual nas populações associadas ao ambiente artificial, provavelmente está influenciada pelo tamanho amostral, onde o menor número de machos não representa adequadamente a população. Desta maneira, considera-se que as populações de *P. megistus* em Bambuí e Piracema mantêm suas características naturais, sendo o ambiente silvestre a principal origem das infestações domiciliares.

De acordo com a teoria atual de dispersão de *P. megistus*, esta espécie adentrou o Brasil, a partir do domínio atlântico brasileiro, através das matas úmidas e ciliares, utilizando a domiciliação para ocupar as áreas mais áridas (Aragão 1961, Forattini 1980). Ao avaliar a proximidade entre as casas com notificações do barbeiro e os fragmentos da vegetação nativa dos municípios, foi observado uma maior proximidade destas com a Floresta Semidescídua, tanto em Bambuí, como em

Piracema. Esta classe de vegetação, provavelmente, mantém ecótopos naturais mais adequados para *P. megistus*, permitindo o estabelecimento de colônias silvestres. Por outro lado, a degradação desta vegetação leva à rápida redução dos recursos utilizados pelos triatomíneos promovendo a dispersão da espécie em direção às residências mais próximas.

No município de Piracema, a pesquisa realizada foi inédita, sendo avaliadas pela primeira vez as características do ciclo de transmissão silvestre de *T. cruzi*. Embora os locais selecionados tenham sido sistematicamente investigados, não foram detectados focos naturais do triatomíneo. Fato que deve ser levado em consideração é a baixa frequência de notificações, grande parte formada por barbeiros adultos sem a presença de colônias domiciliares. As re-infestações também não foram freqüentes. De acordo com Silveira (2000) a intensidade da infestação domiciliar a partir dos focos silvestres, depende da densidade de triatomíneos nos ecótopos naturais, do número destes ecótopos próximos às casas e o tipo de relação que o morador local tem com o ambiente silvestre.

Em Bambuí, o estudo do ciclo natural de *T. cruzi* foi amplamente estudado ao longo das décadas, no intuito de compreender as suas diferentes interrelações com as infestações e reinfestações domésticas. Entre as atividades rotineiras de controle vetorial e atendimentos aos pacientes locais, o PAEED conduziu estudos de infecção em reservatórios (silvestres e naturais) e investigações por focos silvestres de barbeiros. Além das atividades realizadas pelos funcionários do Posto, moradores rurais e caçadores foram mobilizados para a procura de triatomíneos em ninhos, esconderijos e diferentes abrigos de animais silvestres (Dias 1982). Estas pesquisas possibilitaram o encontro dos triatomíneos *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965, em ninhos de aves Furnariidae, e *R. neglectus*, em palmeiras, principalmente em *Acrocomia aculeata* (macaúba). Embora muito abundante no ambiente artificial, nunca foram encontradas colônias de *T. infestans* no meio silvestre. Dias (1945), no entanto, relata o encontro de ninfas desta espécie num ninho do gambá *Didelphis albiventris*, em uma árvore no ambiente peridomiciliar na localidade Lagoa dos Monjolos, região periurbana do município. Mesmo que não tenham sido encontradas colônias naturais de *P. megistus*, a grande presença da espécie no ambiente

domiciliar foi associada à ecótopos umbrosos no ambiente natural (Dias 1945, Dias 1982).

A espécie *R. neglectus*, embora não demonstre importância epidemiológica no município, foi capturada em macaúbas nas localidades de Capoeirão (distante das casas) e Caatinga, num peridomicílio (3 m da residência). De acordo com Dias (1982) esta espécie é encontrada desde a década de 50, infestando cerca de 30% das palmeiras investigadas. Foi capturada em algumas oportunidades no ambiente domiciliar até 1974, onde não houve mais registro de capturas.

O foco natural de *P. megistus* encontrado no município de Bambuí, contribui para o conhecimento das características naturais da espécie e corrobora com diferentes trabalhos realizados em outros Estados brasileiros, onde observa-se uma preferência por habitats arborícolas: Rio Grande do Sul – ocos de árvores (Santos-Jr 2007); Santa Catarina – ocos de árvores e touceiras de gravatás (Grisard *et al.* 2000, Leal *et al.* 1961, Schempler-Jr *et al.* 1985); São Paulo - ocos e anfractuosidades de árvores, bromélias, palmeiras e frestas entre pedras (Barretto *et al.* 1964, 1967; Forattini *et al.* 1970, 1977, 1978); Rio de Janeiro - ocos de árvores (Miles *et al.* 1982); Minas Gerais – ocos e anfractuosidades de árvores, palmeiras, frestas entre pedras e tocas no chão (Barretto *et al.* 1978, Neves 1979).

Segundo Schempler-Jr *et al.* (1985) focos naturais de barbeiros encontrados entre 15 e 300 m das residências favorecem as visitas de triatomíneos adultos ao ambiente domiciliar. O estágio das ninfas encontradas no ambiente natural está de acordo com Dias & Dias (1968), que demonstraram uma maior abundância de ninfas de estádios iniciais entre os meses de abril e junho, correspondentes às últimas posturas realizadas no final do verão, período também de redução da presença de indivíduos adultos nas residências. A verificação dos parâmetros ambientais no foco natural de *P. megistus*, demonstrou uma menor variação de temperatura e umidade relativa (UR) no interior do ecótopo em relação ao ambiente externo. A amortização gerada pelo abrigo, promove uma maior proteção dos triatomíneos das intempéries externas, principalmente para ninfas de estádios iniciais. A média da UR no interior do ecótopo se manteve próxima ao índice máximo observado. Pires (2003) demonstrou que a UR de 73% apresenta uma melhor performance na eclosão de ovos e na ecdise de ninfas em *P. megistus*.

O foco silvestre de Bambuí foi descoberto a partir de um inseto fêmea notificado no ambiente intradomiciliar, cinco meses antes da amostragem em campo. O atendimento desta notificação resultou apenas no encontro de uma marca de fezes no paiol (também utilizado como galinheiro), sem a presença de colônias ou outros adultos do triatomíneo. A árvore com a colônia silvestre estava à 54 m da residência notificada. Cogita-se que a fêmea possa ter realizado posturas no ambiente natural, antes de visitar a residência onde foi capturada. O registro anterior de barbeiros nesta localidade foi em maio de 2009, à aproximadamente 3 km do foco silvestre. Considerando a ausência de colônias peridomiciliares próximas a este foco natural e a estabilidade do ecótopo encontrado (árvore grande, com refúgios para inúmeros hospedeiros naturais), acredita-se que as ninfas capturadas representem parte da população silvestre de *P. megistus* de Bambuí, a qual tem circulado ao longo dos anos entre os fragmentos naturais do município. O laborioso encontro deste foco natural sugere uma baixa frequência da espécie no meio silvestre, ainda assim capaz de invadir o ambiente domiciliar ao longo dos anos, mesmo na época de predominância de *T. infestans*.

Diferentes trabalhos têm indicado o ecletismo alimentar de *P. megistus* tanto em ninfas como adultos (Fernandes *et al.* 1992, Lorosa *et al.* 2000). Lorosa *et al.* (2000), no Rio Grande do Sul, analisando a fonte alimentar de adultos da espécie capturados no ambiente domiciliar encontraram uma presença de aves (possivelmente galinhas), seguida de humanos, com roedores e gambás em menor frequência. O maior encontro do barbeiro nos galinheiros de Bambuí e Piracema, demonstrou a importância destes ecótopos na manutenção das colônias peridomiciliares. Sendo o galinheiro um hábitat passível de visitas de animais silvestres (como gambás e tatus) para procura de alimento, torna-se um importante local de contato entre mamíferos silvestre e colônias peridomiciliares de triatomíneos. Dada a grande capacidade infectiva de *P. megistus* por *T. cruzi* (Minter *et al.* 1977, Ribeiro *et al.* 1984), colônias do barbeiro nestes locais podem elevar os riscos de transmissão da doença de Chagas ao homem e animais domésticos.

A avaliação das fontes alimentares encontradas demonstram a dinâmica do barbeiro entre os ambientes silvestre, peri e intradomiciliares. É possível identificar

uma estada dos barbeiros (antes de entrar no intradomicílio) no ambiente peridomiciliar, indicado pelas reações de ave, ave/gato e ave/cão, ou no ambiente silvestre, a partir das reações de cão/tatu e ave/cavalo/gambá. Os hospedeiros associados às ninfas capturadas no peridomicílio (como sangue humano) sugerem uma dispersão entre o intra e peridomicílio. Forattini *et al.* (1972) observaram mobilidade em ninfas de 4° e 5° ínstar de *Triatoma arthurneivai* (Lent & Martins, 1940) deslocando-se até 10 metros entre os habitats estudados. Um comportamento semelhante foi sugerido para *P. megistus* por Forattini *et al.* (1977).

Os animais domésticos utilizados com maior frequência foram as aves e os cães. Em Piracema, onde um número menor de amostras foi avaliado, a presença de cães foi notada em uma ninfa capturada no peridomicílio (pilha de lenhas), associado à aves. Dado o convívio direto com o homem, somado ao fato de transitarem nos ambientes domésticos e silvestre, os cães podem ser considerados os principais reservatórios domésticos de *T. cruzi* (Castañera *et al.* 1998, Gürtler *et al.* 1991). Os humanos, os cães e as galinhas são os mais freqüentes hospedeiros utilizados por triatomíneos (Gürtler *et al.* 1997). Fernandes *et al.* (1992) avaliando a fonte alimentar de *P. megistus* em Bambuí, demonstraram maior presença de sangue humano, seguido de cão, em barbeiros capturados no ambiente doméstico.

A instalação do PAEED (nome atual do CEPMCh) em Bambuí permitiu o registro de 369 casos agudos da doença de Chagas, entre 1939 e 1969, e dez mil casos crônicos. Com o início do controle vetorial, os casos agudos foram rapidamente reduzidos, ocorrendo o último registro em 1969. A maioria dos casos de doença de Chagas em Bambuí foi relacionada à transmissão vetorial por *T. infestans*, ocorrida entre 1945 e 1958 (Dias 1982). Os altos índices de infecção e dispersão observados para *P. megistus*, em 1939/40 (época da descrição dos primeiros casos agudos no município), mostram a elevada capacidade de domiciliação desta espécie. Mesmo desalojada por *T. infestans*, entre 1944 e 1963, *P. megistus* ainda manteve colônias naturais com capacidade de reinfestar o ambiente doméstico (Dias 1982, Forattini 1980).

Nos estudos iniciais sobre a transmissão da doença de Chagas, foram realizadas análises de xenodiagnóstico em diversos hospedeiros, inclusive o

homem. Os primeiros reservatórios do *T. cruzi* reconhecidos em Bambuí foram o homem, o cão e o gato. Mais tarde, também foram encontrados animais silvestres infectados, como gambás (*D. albiventris*), roedores (diferentes espécies) e macacos (*Alouatta* sp. e *Cebus apella*). Dos mais de 300 tatus analisados, nenhum demonstrou infecção pelo parasito (Dias 1982), bem como nenhuma toca destes animais apresentou o barbeiro *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) vetor associado à dasipodídeos por Chagas em 1912.

Estudos realizados entre agosto de 1986 e dezembro de 1988 no município de Bambuí, analisaram 154 barbeiros recebidos através de notificação dos moradores, que demonstraram um índice de infecção de 9,8%. Adicionalmente, foi encontrada uma colônia do barbeiro. Os dados desta época, já demonstravam um menor número de barbeiros quando comparado à PI de 1983. Neste estudo também foi encontrado *R. neglectus* (não infectados) em macaúbas. Outras pesquisas realizadas ainda na década de 80, realizaram capturas de *D. albiventris*, onde os índices de infecção por *T. cruzi* variavam entre o ambiente investigado: silvestre (37%), peridomicílio rural (51%) e peridomicílio urbano (8%). Outros eventos observados no município, como o encontro de parasitos no lúmen das glândulas anais e a ocorrência de auto-cura, permitem considerar estes marsupiais como principais reservatórios silvestres de *T. cruzi* de Bambuí (Fernandes *et al.* 1991, Fernandes *et al.* 1989, 1994a).

Segundo Fernandes *et al.* (1994b), entre as populações de *D. albiventris* do município de Bambuí pode ser encontrado o grupo de *T. cruzi* Z1 (TCI segundo Zingales *et al.* 2009). Por outro lado, em *P. megistus*, obtidos nos ambientes domiciliares, foi possível caracterizar tanto *T. cruzi* Z1 como Z2 (TCII, Zingales *et al.* 2009), Associados aos ambientes silvestre e domésticos em Minas Gerais, respectivamente. O encontro dos dois grupos do parasito nestes vetores evidência uma sobreposição dos ciclos de transmissão de *T. cruzi* neste município. O encontro de um cão infectado com TCI e um gato com TCII corroboraram com os dados observados acima.

Atualmente, os dados observados sobre *P. megistus* e *D. albiventris* demonstram uma redução no ciclo natural de *T. cruzi*, verificada pelo baixo índice de

infecção encontrado nos indivíduos amostrados. Esta redução pode ser associada às contínuas atividades de controle vetorial e a degradação do meio natural ocorridas ao longo das décadas (Ceballos *et al.* 2006, Dias 1982). Como observado nas amostragens de campo, a atividade antrópica inicia-se com o corte da vegetação arbustiva, seguindo para a gradual derrubada das árvores de maior porte, até a formação do pasto. O impacto antrópico altera a riqueza das espécies, afetando diretamente o ciclo de transmissão natural de *T. cruzi* (Xavier *et al.* 2007). Grande parte das capturas peridomiciliares ocorreu próximo às moitas de bambús, as quais tornam-se muitas vezes o único refúgio disponível para diferentes espécies nativas.

As estações do ano que apresentaram maior captura de gambás (verão) e maior diversidade na coleta (outono), correspondem às épocas de maior dispersão de barbeiros adultos e presença de ninfas, respectivamente (Dias & Dias 1968). A maior captura de animais no outono, está associada à menor disponibilidade de alimento no ambiente natural, levando os animais com maior sinantropia à visitar, mais freqüentemente, o ambiente doméstico (Rodrigues 2007, Schweigmann *et al.* 1999).

No município de Piracema, segundo o Inquérito Sorológico Brasileiro para Infecção Chagásica, entre 1975 e 1980, foram encontrados nove casos da doença, em pacientes de diferentes idades (1 a 6 anos: 1 caso, 15 a 29 anos: 5 casos, 30 a 44 anos: 2 casos, mais de 45 anos: 1 caso), sendo dois autóctones. No município de Itaguara, ao lado de Piracema, foi registrado o encontro de um (1) *T. infestans* e um (1) *P. megistus* no final da década de 40 (Pellegrino 1950). Segundo o Inquérito nacional, em Itaguara foram registrados 19 casos da doença de Chagas (1 a 6 anos: 2 casos, 7 a 14 anos: 8 casos, 15 a 29 anos: 2 casos, 30 a 44 anos: 4 casos, mais de 45 anos: 3 casos), sendo 17 autóctones. Dado os poucos registros de *T. infestans*, acredita-se que o principal vetor da doença na região tenha sido *P. megistus*.

A partir dos dados atuais, em Piracema foi encontrado índices de infecção para *T. cruzi* mais elevados do que Bambuí. Por apresentar um desenvolvimento agropecuário menos intenso, Piracema demonstra áreas de plantio e pastagens

mais fragmentadas. Este uso da terra menos extensivo colabora para uma maior presença de fragmentos naturais, caracteristicamente florestados, comportando uma maior presença da fauna silvestre. A maior capturabilidade de *D. aurita*, quando comparada à *D. albiventris*, pode estar associada ao maior tamanho populacional e dispersão da primeira espécie (Pires *et al.* 2002, Rodrigues 2007). Seguindo o mesmo padrão de Bambuí, a maior parte das capturas de Piracema ocorreram no verão e a maior diversidade encontrada no outono. Em *D. albiventris*, a presença de *T. cruzi* foi observada apenas em indivíduos sub-adultos e adultos (IV a VII). Schweigmann *et al.* (1999) observaram que o índice de infecção aumenta proporcionalmente com a idade destes marsupiais.

O maior índice de infecção observado nos *D. albiventris* capturados em Piracema, pode estar associado à sua menor dispersão em relação à *D. aurita* (Rodrigues 2007), formando grupos mais permanentes e igualmente susceptíveis a infecção por *T. cruzi*. Embora tenham ocorrido duas capturas de *D. aurita* no peridomicílio (realizadas manualmente no centro da cidade e área periurbana), esta espécie não é normalmente encontrada no ambiente doméstico em Piracema. Ao contrário, *D. albiventris* foi encontrado em ninhos localizados em áreas peridomiciliares, mesmo quando capturados no ambiente natural (mais de 200 m das residências), como observado com o uso do carretel de rastreamento.

A análise conjunta dos métodos de hemocultura e xenodiagnóstico demonstraram uma maior detecção de parasito nos reservatórios analisados, principalmente em Bambuí. Segundo Fernandes *et al.* (1991) a baixa parasitemia persistente, característica em gambás, inviabiliza o exame direto de sangue, sendo mais adequado o uso de técnicas parasitológicas indiretas. O emprego da PCR-Multiplex, embora não tenha demonstrado maior sensibilidade que os testes rotineiros de campo, mostrou ser uma ferramenta útil na investigação da infecção por *T. cruzi* em *D. albiventris* e *D. aurita*, podendo ser associada tanto à hemocultura quanto ao xenodiagnóstico.

Em diferentes países das Américas, trabalhos têm demonstrado infecção de cães domésticos por *T. cruzi* e seu possível uso como indicadores de áreas de risco de transmissão humana da doença de Chagas (Barr 2009, Castañera *et al.* 1998,

Estrada-Franco *et al.* 2006, Gürtler *et al.* 1991, Kjos *et al.* 2008, Lauricella *et al.* 1998). Outros animais domésticos como gatos, porquinhos-da-índia, (*Cavea* sp.), coelhos e porcos domésticos também têm sido associados à transmissão doméstica da doença (Gürtler *et al.* 2007, Levy *et al.* 2006, Roque *et al.* 2008).

Segundo Gürtler *et al.* (2007), a taxa de infecção de cães em áreas de transmissão vetorial ativa de *T. cruzi* está associada, principalmente, com a idade avançada do animal e a densidade de triatomíneos infectados no ambiente domiciliar. Cardinal *et al.* (2006) demonstraram que o uso do teste imunocromatográfico *Trypanosoma DetectTM Rapid test*, apresentou alta especificidade (>94%) e sensibilidade (>96%) para a avaliação de cães tanto em áreas endêmicas, como não endêmicas, para doença de Chagas na Argentina.

Através da realização dos três métodos sorológicos utilizados, sugere-se uma participação dos cães no ciclo de transmissão doméstico de *T. cruzi*, melhor notada em Piracema, do que em Bambuí. No entanto, nenhuma infecção foi confirmada por testes parasitológicos ou moleculares, o que sugere uma baixa parasitemia. Trabalhos realizados com reinfecções experimentais demonstraram o aumento da parasitemia em camundongos, macacos e cães com *T. cruzi* (Cabeza Meckert & Laguens 1981, Riarte *et al.* 1995, Machado *et al.* 2001). Desta maneira, a reinfecção pode permitir uma maior circulação do parasito no hospedeiro, aumentando a possibilidade de sua detecção em exames parasitológicos. Desta maneira, áreas onde a transmissão vetorial foi interrompida podem apresentar uma redução na circulação de *T. cruzi* no ambiente, dificultando sua detecção por exames parasitológicos, como observado nos municípios de Bambuí e Piracema.

Em suma, o presente trabalho possibilitou o aprofundamento nos diferentes aspectos do ciclo de transmissão do *T. cruzi*, a partir de observações realizadas nos municípios de Bambuí e Piracema. Em ambos os casos, se detectou *P. megistus* como o principal vetor potencial à transmissão da doença de Chagas ao homem, preconizando a manutenção de VE constante. A julgar pelos nossos achados e série histórica, a ocorrência do ciclo doméstico é ainda importante em ambas as áreas estudadas, à custa de aportes de fêmeas já fecundadas originadas do ciclo silvestre, principalmente no período mais quente e úmido do ano (outubro a março). Essas

migrações se fazem em primeira instância, aparentemente, para o espaço peridomiciliar, oportunizando posteriormente invasão e colonização do intradomicílio, onde as capturas pelos moradores foram mais freqüentes. A principal fonte de infecção dos triatomíneos foi associada aos gambás *Didelphis* sp., abundantes nos municípios. No entanto, as avaliações sorológicas também indicaram o envolvimento de cães na manutenção do parasito no ambiente doméstico. Desta maneira, sugere-se que ambos reservatórios sejam incluídos em avaliações das áreas com risco de transmissão do *T. cruzi* ao homem. Em que pesem os dados numéricos relativamente baixos, vislumbra-se uma tendência à redução progressiva das taxas de infestação domiciliar. Isto se deveria, em princípio, à eficácia das ações de vigilância e à diminuição das populações silvestres da espécie, fruto de desmatamento e outras ações antrópicas que têm reduzido, cada vez mais, as áreas naturais dos municípios estudados.

7 CONCLUSÕES

O estudo da infestação domiciliar e dispersão de *Panstrongylus megistus*, confirmam o sucesso das ações de controle que culminaram na interrupção da transmissão vetorial. No entanto, a frequente presença do barbeiro no ambiente domiciliar, mesmo em baixa intensidade, ressalta a importância da permanente vigilância epidemiológica nas áreas estudadas;

A análise da dinâmica populacional de *Panstrongylus megistus*, através da morfometria geométrica, demonstrou uma ausência de estruturação entre as populações originadas de colônias domiciliares das obtidas por triatomíneos visitantes. Estas características semelhantes indicam um presente fluxo gênico entre os indivíduos, ressaltando a importância do ambiente natural nas infestações e reinfestações do ambiente domiciliar de Bambuí e Piracema;

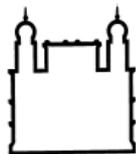
A identificação das fontes alimentares utilizadas por *Panstrongylus megistus* permitiu avaliar a grande mobilidade de ninfas e adultos entre os ambientes silvestre, peri e intradomiciliares. Esta mobilidade foi detectada, principalmente, pelo encontro de uma fêmea no intradomicílio (quarto) com reação para ave/cavalo/gambá e de uma ninfa no peridomicílio (galinheiro) com reação para sangue humano. Os principais hospedeiros identificados nas amostras, aves (possivelmente galinhas) e cães, reforçam o papel do galinheiro na manutenção das colônias peridomiciliares do barbeiro, e do cão como principal reservatório doméstico do *T. cruzi*;

A investigação do ambiente natural do município de Bambuí levou ao encontro do 1º foco silvestre de *Panstrongylus megistus*, após 69 anos de estudo. O encontro deste foco natural revela que, mesmo com baixa densidade no meio silvestre, as populações do triatomíneo podem seguir infestando o ambiente domiciliar, o que reforça a importância das ações de controle vetorial nas áreas estudadas;

O estudo dos índices de infecção observados em *Panstrongylus megistus*, *Didelphis albiventris*, *Didelphis aurita* e cães domésticos, demonstrou a presença de *Trypanosoma cruzi* (TCI), circulando entre os ambientes naturais e artificiais nos dois municípios estudados. Os índices de infecção demonstrados pelos marsupiais, reforçam a importância destes reservatórios na manutenção do ciclo silvestre do parasito, devendo ser considerados nas detecções de áreas de risco da transmissão da doença de Chagas.

8 ANEXOS

8.1 termo de consentimento utilizado para coleta de amostras de sangue dos cães nos municípios de Bambuí e Piracema.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou
Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas

Termo de consentimento para coleta de sangue de cães e gatos domésticos

_____, ____ de _____ de _____.

Amostra n°: _____

Endereço para contato do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou:

Dra. Liléia Diotaiuti – Coordenadora do projeto

Endereço: Avenida Augusto de Lima, nº 1715, bairro Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP: 30190-002.

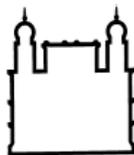
Telefone para contato: (31) 3349-7763

Após ler e receber explicações sobre a pesquisa, e ter meus direitos de:

1. Receber resposta a qualquer pergunta e esclarecimento sobre os procedimentos, riscos, benefícios e demais informações relacionados à pesquisa;
2. Retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar da pesquisa;
3. Não ser identificado e ser mantido o caráter confidencial das informações relacionadas à privacidade.

Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel: 31 3349-7762 - Fax: 31 3295-3115
e-mail: diotaiuti@cpqrr.fiocruz.br

8.1 termo de consentimento utilizado para coleta de amostras de sangue dos cães nos municípios de Bambuí e Piracema – Continuação.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou
Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas

Eu, _____, portador do documento _____ de n° _____, autorizo a coleta de sangue (5 mL) do meu animal doméstico, cão ou gato, que atende pelo nome de _____ para exame da doença de Chagas realizado pelo projeto "Dinâmica do *Panstrongylus megistus* nos ciclos de transmissão de *Trypanosoma cruzi* em áreas de cerrado e Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais, Brasil, coordenado pela Dra. Liléia Diotaiuti (Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ/ MG). Também estou de acordo que os resultado poderão ser apresentados nos meios de divulgação científica (resumos em eventos científicos, palestras e publicações em revistas de cunho científico), onde meu nome não é citado.

Assinatura: _____

Eu, _____, declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto ao proprietário do animal participante da pesquisa.

Local/data: _____, _____ de _____ de 2009.

Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel: 31 3349-7762 - Fax: 31 3295-3115
e-mail: diotaiuti@cpqrr.fiocruz.br

8.2 Número de cães amostrados para as análises de infecção por *Trypanosoma cruzi* nas nas diferentes localidades do município de Bambuí.

Localidade	Cães	Machos	Fêmeas	Jovem	Adulto	Idoso
				até 2 anos	2 a 6 anos	acima 8 anos
Abacaxi	7	6	1	1	6	0
Açudes*	7	4	3	1	6	0
Água Fria	2	1	1	0	2	0
Água Santa	3	1	2	3	0	0
Algodão	3	3	0	2	1	0
Alto Cruzeiro	3	1	2	0	2	1
Araras	6	6	0	3	3	0
Araras II	6	4	2	1	4	1
Barra do Sambura	4	1	3	0	2	2
Bela Vista	2	0	2	0	1	1
Boca da Mata	1	1	0	0	1	0
Bom Sucesso*	1	1	0	0	1	0
Caatinga	4	3	1	0	4	0
Cabaças	4	4	0	0	4	0
Campos*	9	9	0	1	5	3
Caninana	3	3	0	0	3	0
Capão	1	1	0	0	1	0
Capoeira	5	3	2	0	4	1
Capoeirão	5	5	0	1	2	2
Carapuça	5	5	0	0	5	0
Coqueiros	6	5	1	1	5	0
Gameleira	2	2	0	0	2	0
Glória	2	1	1	2	0	0
Gordura	4	2	2	1	3	0
Guariba	4	2	2	0	4	0
Lagoa do Junco	2	2	0	0	1	1
Lobeira	1	1	0	0	1	0
Luzia	3	3	0	1	1	1
manso	1	1	0	0	0	1
Mata do João Minguta	4	3	1	0	4	0
Mata do São Leão	2	2	0	1	1	0
Mata dos Régis	1	0	1	0	1	0
Morro Branco	4	3	1	1	3	0
N ^{ssa} S ^{ra} Santana*	5	3	2	4	0	1
Nações*	1	1	0	0	1	0
N ^{ssa} S ^{ra} Fátima*	1	1	0	0	1	0

*Amostragens nas regiões urbana e periurbana do município.

Obs.: Esta tabela tem continuidade na próxima página.

8.2 Número de cães amostrados para as análises de infecção por *Trypanosoma cruzi* nas diferentes localidades do município de Bambuí – Continuação.

Localidade	Cães	Machos	Fêmeas	Jovem	Adulto	Idoso
				até 2 anos	2 a 6 anos	acima 8 anos
Olhos D'água	17	16	1	2	14	1
Pau Ferro	18	10	8	4	13	1
Pedra Branca	1	1	0	0	1	0
Perdição	2	1	1	2	0	0
Ponte Alta	7	4	3	0	3	4
Posses	19	17	2	5	13	1
Quartéis	2	1	1	0	2	0
Retiro do Alcino	3	2	1	0	2	1
Sagrado Coração de Jesus*	5	0	5	0	4	1
Santo Estevão	5	4	1	1	4	0
Sertãozinho I	8	7	1	0	8	0
Sertãozinho II	3	3	0	0	3	0
Silvas	1	1	0	1	0	0
Tabatinga	5	2	3	2	3	0
Três Barras	4	3	1	0	4	0
Turvo	1	1	0	0	1	0
Valérios	6	3	3	0	5	1
Vassourão	5	3	2	2	0	3
TOTAL	236	173	63	43	165	28

* Amostragens nas regiões urbana e periurbana do município.

8.3 Número de cães amostrados para as análises de infecção por *Trypanosoma cruzi* nas diferentes localidades do município de Piracema.

Localidade	Cães	Machos	Fêmeas	Jovem	Adulto	Idoso
				até 2 anos	2 a 6 anos	acima 8 anos
Aguada	3	2	1	1	2	0
Angá II	9	8	1	3	4	2
Bagaço	8	5	3	0	8	0
Barro Preto	1	1	0	1	0	0
Bom Retiro	1	1	0	1	0	0
Bom Retiro de Baixo	5	5	0	2	1	2
Bom Retiro de Cima	2	1	1	1	1	0
Cachoeirinha	5	4	1	0	4	1
Canoeiros	4	4	0	1	3	0
Castro*	2	1	1	1	1	0
Colônia	4	4	0	2	1	1
Coqueiro	6	5	1	2	1	3
Córrego dos Peixes	4	3	1	2	1	1
Correia	4	3	1	2	1	1
Costas	4	4	0	3	0	1
Engenho	5	2	3	1	4	0
Fundão	3	3	0	2	1	0
Geadá	7	7	0	4	3	0
Joaquim Rodrigues	6	6	0	2	4	0
Lage	2	2	0	0	2	0
Limeira	7	6	1	2	4	1
Manga Larga	3	2	1	1	2	0
Mata dos Correias	1	1	0	0	1	0
Morro do Cipó	5	5	0	1	4	0
Morro Grande	1	1	0	0	1	0
Morro Queimado	1	1	0	0	1	0
Mosquito	18	16	2	7	9	2
Mundéus	2	1	1	1	0	1
Paciência	7	5	2	3	4	0
Paracatú	1	1	0	1	0	0
Perobas de Baixo	4	1	3	3	1	0
Perobas de Cima	5	3	2	0	4	1
Perobas do Meio	16	10	6	10	3	3
Pintos	51	28	23	11	32	8

*Amostragens nas região periurbana do município.

Observação: Esta tabela tem continuidade na próxima página.

8.3 Número de cães amostrados para as análises de infecção por Trypanosoma cruzi nas diferentes localidades do município de Piracema - Continuação.

Localidade	Cães	Machos	Fêmeas	Jovem	Adulto	Idoso
				até 2 anos	2 a 6 anos	acima 8 anos
Piracema – centro*	3	3	0	2	1	0
Quilombo	1	1	0	1	0	0
Rincão	3	3	0	0	3	0
Sampaio	2	0	2	0	0	2
Sete buraco	5	2	3	1	3	1
Sobrado	11	8	3	6	4	1
Souza	8	6	2	4	3	1
Tapera	2	2	0	0	2	0
Taquaral	5	5	0	2	2	1
Tatu	1	1	0	0	1	0
Vargem da costa	3	3	0	1	2	0
TOTAL	251	186	65	88	129	34

*Amostragens nas região periurbana do município.

8.4 Menção honrosa recebida na 26ª Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas e 14ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, Uberaba, 2010.

26ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas

14ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses

Desenvolvimento científico-tecnológico e inovação em saúde: bases para o estabelecimento de novos paradigmas no controle da Doença de Chagas e das leishmanioses nas Américas

Certificado

Certifico que,

José Eloy dos Santos Júnior, Christiane Santos Matos, João Carlos Pinto Dias, Liléia Diotaiuti.

Participou da 26ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e da 14ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses no período de 26 a 29 de outubro de 2010 em Uberaba (MG) na qualidade autores do trabalho intitulado: “Uso de PCR–Multiplex na detecção da infecção natural por *T. cruzi* em gambás (*Didelphis sp.*) em duas áreas endêmicas para doença de Chagas, Minas Gerais, Brasil”, e receberam **MENÇÃO HONROSA** pela apresentação oral do trabalho em epígrafe.

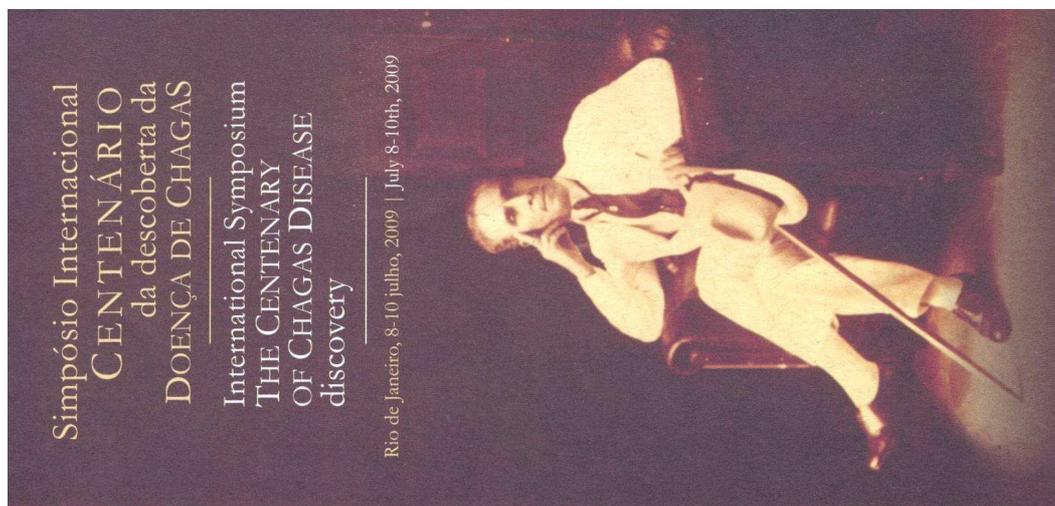
Uberaba, 29 de outubro de 2010



Guilherme Loureiro Werneck
Coordenador-geral da Reunião



8.5 Medalha de melhor trabalho no tema: Ecoepidemiologia - Simpósio Internacional Comemorativo do Centenário da Descoberta da doença de Chagas. Rio de Janeiro, 2009.



Certificamos que

na temática **Ecoepidemiologia**
o Poster número 1900 intitulado

"Evaluation Of Trypanosoma Cruzi Transmission Cycles Associated With Panstrongylus Megistus And Didelphis Spp. In Cerrado And Atlantic Forest Areas In Minas Gerais State, Brazil"

apresentado por

JOSÉ ELOY DOS SANTOS JÚNIOR; CARLOTA JOSEFOVICZ BELISÁRIO; JOÃO CARLOS PINTO DIAS; LILÉIA DIOTAIUTI

foi ganhador da

Medalha do Centenário da

Descoberta da Doença de Chagas (1909-2009),
durante o **Simpósio Internacional Comemorativo do Centenário da Descoberta da Doença de Chagas,**

Rio de Janeiro, 10 de julho de 2009

PAULO GADELHA
Presidente da Fundação Oswaldo Cruz



CERTIFICADO | **CERTIFICATE**

8.6 Publicado on line na página do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ/MG, para posterior publicação em livro da Editora FIOCRUZ em comemoração dos 100 anos da descoberta da doença de Chagas, 2009.

b AtvÉÉzÉxÉãxt vÉÇt wV {tzá

José Eloy dos Santos Júnior^{1 2}, Christiane Santos Matos^{1 3} & João Carlos Pinto Dias^{1 4}

O habitat de qualquer parasito corresponde aos seus hospedeiros. O mesmo ocorre com o *Trypanosoma cruzi*, podendo ser encontrado em diferentes espécies de barbeiros e mamíferos ao longo das Américas. Carlos Chagas, como ávido seguidor das teorias de Louis Pasteur e Robert Koch sobre a ação dos microrganismos na origem das enfermidades, desde cedo já compreendia a importância dos insetos na transmissão de doenças como malária e febre amarela, bem como o papel dos reservatórios na manutenção das mesmas. À par de sua luta contra a malária em Lassance, Chagas explorou o homem e a natureza, numa rotina que Oswaldo pedia de seus seguidores. Enviado ao povoado de São Gonçalo das Tabocas, atual Lassance, em Minas Gerais, para a luta contra o paludismo, Carlos Chagas realiza uma das maiores descobertas de sua carreira, uma nova entidade mórbida que denominou “tripanossomíase americana”. Entretanto, que elementos levaram o cientista para a descoberta de sua maior obra? Quais atores agiram, mesmo que indiretamente, guiando seus passos em direção desta nova enfermidade? Em Lassance, provavelmente na busca de possíveis reservatórios naturais da malária, Carlos Chagas encontrou no sagüi (*Calithrix penicillata*), o que poderia ser o primeiro passo em direção a sua descoberta, formas tripomastigotas de um novo tripanossoma, batizado de *T. minasense* (Chagas, 1908). No mesmo ano, em visita a Pirapora (MG), seu companheiro de viagem, o médico Belisário Penna, lhe entregou insetos conhecidos popularmente como barbeiros ou chupões (*Panstrongylus megistus*), os quais se reproduziam aos milhares nas cafuas da região, alimentando-se dos moradores. Ao analisar estes insetos, Carlos Chagas observou criticídias (formas epimastigotas) e cogitou serem estas fases evolutivas de *T. minasense* observado nos sagüis. Para melhor elucidação do caso, os insetos foram enviados ao Rio de Janeiro,

¹ Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou; ² Biólogo, Doutor em Ciências da Saúde; ³ Biomédica, Doutoranda em Ciências da Saúde; ⁴ Médico, Doutor em Medicina Tropical, Pesquisador Emérito.

aos cuidados do seu mestre Oswaldo Cruz, onde seria possível realizar infecções experimentais em sagüis livres de qualquer parasitos. Chamado por seu mestre para voltar ao Rio de Janeiro, o cientista observou um tripanossoma diferente daqueles dos sagüis, denominando-o *T. cruzi*. Em laboratório, infecções experimentais em coelhos, cobaias e outros mamíferos demonstraram uma forte reação patogênica associada ao parasito, surgindo a dúvida se a nova entidade nosológica poderia também infectar humanos. Chagas, aí, antecipava-se à teoria dos focos naturais, que Pavlovsky brilhantemente viria a enunciar em 1934: “Em outras palavras, um foco natural de doenças é relacionado a uma paisagem geográfica específica, tais como a taiga com uma certa composição botânica, um quente deserto de areia, uma estepe etc., isto é, uma biogeocoenosis. O homem torna-se vítima de uma doença animal com foco natural somente quando permanece no território destes focos naturais em uma estação do ano definida e é atacado como uma presa por vetores que lhe sugam o sangue”. Desta maneira, o cientista volta a Lassance, em 1909, e inicia uma série de investigações hematológicas tanto em pacientes enfermos, quanto em animais domésticos. Após inúmeras investigações e prolongados exames, um gato doméstico, residente de uma caçua infestada por barbeiros, demonstrou a presença de *T. cruzi*, indicando pela primeira vez o ciclo doméstico do parasito. Esta descoberta culminou no encontro do primeiro caso humano da moléstia batizada posteriormente em sua homenagem, doença de Chagas. Mais tarde, em 1912, Carlos Chagas detecta o parasito em dasipodídeos, popularmente conhecidos como tatus (associados ao barbeiro *P. geniculatus*), revelando o ciclo silvestre do *T. cruzi* e caracterizando os diferentes ciclos de transmissão de sua descoberta. O feito de Chagas abarca toda a concepção atual da tripanossomíase americana, definitivamente entendida como uma enzootia silvestre que paulatinamente também assumiu um caráter de zoonose e de antropozoonose, mediante modificações ambientais, movimentos migratórios e ação antrópica. Tudo à luz de esplendoroso trabalho e das evidências demonstradas por animais preciosos em suas contribuições como o macaco, o gato e o tatu.

Referências

Chagas CJR. 1908. Trypanosoma minasense. Brazil-Médico 48 – ano XXII.

Chagas CRJ. 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1: 159-218.

Pavlovsky YN s/d. Natural Nidality of Transmissible Diseases. Moscow: Peace Publishers.

8.7 Publicação de artigo científico na Revista das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz - 2011.

510 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 106(4): 510-513, June 2011

First report of *Panstrongylus megistus* sylvatic focus in municipality of Bambuí, state of Minas Gerais, Brazil

José Eloy dos Santos Júnior¹*, Liléia Diotaiuti, João Carlos Pinto Dias

Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Instituto de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil

In 1943, the Center for the Study and Prophylaxis of Chagas Disease, Oswaldo Cruz Foundation, state of Minas Gerais (MG), was created in the municipality of Bambuí to carry out studies related to Chagas disease in the mid-western region of MG. Since that time, several investigations have been conducted to determine the natural habitat of triatomines, but Panstrongylus megistus colonies have never been found in this region. This paper records the first finding of a P. megistus sylvatic colony in 69 years of research. The characteristics of this ecotope and its implications for the epidemiology of Chagas disease are discussed.

Key words: *Panstrongylus megistus* - sylvatic ecotope - Bambuí - Chagas disease

The municipality of Bambuí is located in the mid-western region of the state of Minas Gerais (MG), 270 km from Belo Horizonte. This region has been the focus of many studies related to Chagas disease. After Chagas was first described (Chagas 1909), the next reports of the disease occurred between 1930-1941, with 25 acute cases described in four MG municipalities; 20 cases were in Bambuí. At that time, *Panstrongylus megistus* was the predominant vector, present in 75% of home infestations, followed by *Triatoma infestans*, at 25% (Martins et al. 1942). In 1943, the occurrence of numerous cases of the disease prompted the founding of the Center for the Study and Prophylaxis of Chagas Disease (CEPMCh), Oswaldo Cruz Foundation/MG, under the management of Dr Emmanuel Dias, who performed several studies on the epidemiology, diagnosis, clinical and prophylaxis of Chagas disease.

When CEPMCh was founded, *T. infestans* was already dominant in the households of the region, overwhelming the native *P. megistus*. Having observed the importance of the insect vector in the emergence of new cases of the disease, Dr Emmanuel Dias worked to develop methods for triatomine control. In the late 1940s, the use of gamma-benzene hexachloride (Gammexane™) led to an immediate reduction in acute cases and to the elimination of vector-borne Chagas disease in Bambuí by the early 1950s. Bambuí is recognised as a pioneer municipality in Chagas disease vector control in the Americas (Dias 1945, 1982, Dias & Pellegrino 1948, Silveira 2000).

These activities led to the elimination of *T. infestans*, a non-autochthonous species last found in 1978. After *T. infestans* was successfully controlled, however, the

native *P. megistus* began gradually to colonise homes and became the principal Chagas vector in the region, where it has persisted at low densities until today. The CEPMCh has since investigated the role of the sylvatic environment in the reinfestation process. These studies discovered *Psammolestes tertius* in Furnariidae bird nests and *Rhodnius neglectus* in palm trees, mainly in *Acrocomia aculeata* (macaúba). No *T. infestans* colony was found in the sylvatic environment, although nymphs of this species were observed in a *Didelphis albiventris* nest close to a residential area in Lagoa dos Monjolos, periurban area of Bambuí. The presence of adult *P. megistus* in the household environment was associated with shady ecotopes syvatics (Dias 1982).

This study aimed to identify the potential natural ecotopes of *P. megistus* and their role in the origin of household foci in Bambuí. To this end, nine field samplings were carried out between February 2008-May 2010. From Bambuí households with the highest number of notifications and proximity to residual natural vegetation were identified through Chagas Disease Control Program (PCDCH) data. These residences were investigated for the presence of triatomines in home environment and in the potential sylvatic habitats.

Peri-domiciliary and domiciliary areas were actively searched with the aid of flashlights and tweezers and the sylvatic environment was examined both by direct search in palm trees and other shelters and by seeking opossum nests by the spool-and-line technique (Miles 1976) with reels made of cylindrical plastic pots using Kooban™ line (Santos-Jr 2007). To evaluate possible natural reservoirs of *Trypanosoma cruzi*, small mammals were captured and checked for Chagas infection by xenodiagnosis and blood culture. Opossum burrows found by the spool-and-line technique were investigated using Noireau traps (Noireau et al. 2002), flashlights, tweezers and pirisa (a flushing-out agent). Material from inside the burrow was collected for screening in the laboratory. Temperature (T) and relative humidity (RH) inside the burrows and in the surrounding environment

Financial support: CNPq, CPqRR/FIOCRUZ-MG
* Corresponding author: santosjr_je@yahoo.com.br
Received 13 December 2010
Accepted 11 February 2011

was monitored with HOBO H8 data loggers (Onset Computer Corporation) programmed to take readings every 15 min and data were processed using the Boxcar Pro 4.3 program. This study was carried out in accordance with Brazilian law (IBAMA written authorisation 16217-3/2008, CEUA P-0502/08). Using the data obtained in the PCDCH, it was possible to compare two distinct periods for *P. megistus*: 1974-1980 and 2005-2010 (Fig. 1). The reduction in the number of positive locations over the years is likely related to a large reduction in the number of notifications and a decrease in the dispersal of the species. Sylvatic habitats in 13 rural localities in Bambuí were also searched; these areas were chosen because they are close to houses where the presence of triatomines has previously been reported. We investigated 123 different natural ecotopes, in which Noireau traps were set daily. Material from these ecotopes (such as branches and leaves) was also collected when possible. In *A. aculeata* (macaúba) palm trees, which are abundant in the area, uninfected *R. neglectus* were found in *caatinga*

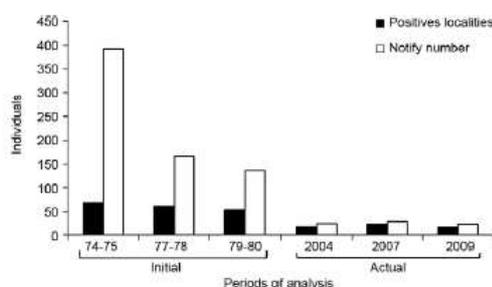


Fig. 1: triatomine reports and localities positive for *Panstrongylus megistus* in the municipality of Bambuí, state of Minas Gerais, in two periods of the Chagas Disease Control Program at the beginning of the epidemiological surveillance phase and in the last decade.

(20°32'24''S 46°01'48''W) and *capoeirão* (20°35'56''S 46°36'19''W). A natural focus of *P. megistus* was detected in only one ecotope (20°11'01''S 46°32'12''W): a living tree (*Dimorphandra mollis* Benth, popularly known as *faveira*) with a large natural hollow, in the village of Olhos D'água in May 2010 (Table). The tree contained nymphs and hatched eggs of triatomines; the nymphs were captured with the aid of the Noireau traps and the eggs by screening the material collected in the tree. Also found at the site were small lizards, a bat, and a large quantity of rodent and *D. albiventris* faeces, indicating that the tree was in frequent use as shelter for these wild animals (Fig. 2). Because *P. megistus* had not been reported in the area or in households in the last two years, the colony was characterised as sylvatic. The HOBO sensor was left installed inside the hollow tree for five days, with one sensor outside as a reference; results show a more constant T and RH inside the tree. Over the course of sampling in Bambuí, 74 wild or synanthropic animals, marsupials and rodents were collected. In sylvatic habitats surrounding the village of Olhos D'água, the following were captured: two marsupial species, *D. albiventris* (5) and *Micoureus* sp. (7) and three rodent species, *Necotomys* sp. (8), *Oecomys* sp. (2) and *Mus musculus* (1). No *T. cruzi* infection was detected in the captured animals or in the *P. megistus* nymphs. This area was searched because a female *P. megistus* had been found inside a house and vestiges of triatomine feces in the barn, which was also used as a henhouse five months previously. The natural focus was 54 m away from the house and the female most likely laid eggs in the natural environment before entering the building. According to Schlemper-Jr et al. (1985), triatomine sylvatic foci in the state of Santa Catarina were found between 15-300 m from the nearest residences, favouring incursions by adult triatomines. The discovery of *P. megistus* nymphs, rather than adults, is in agreement with the findings of Dias and Dias (1968), who found a greater abundance of early-stage nymphs between April-June, corresponding to oviposition in the late summer, when the number of adult insects in houses is

TABLE

Natural ecotopes investigated in 13 localities of municipality of Bambuí, state of Minas Gerais, indicating the triatomine^a foci found

Ecotopes investigated	Quantity (%)	Ecotopes positives	Triatomine foci
Hollow trees and anfractuositities	46 (37)	1/46	<i>Panstrongylus megistus</i> (4 nymphs of 2th and 3th stages and 4 hatched eggs)
Burrows in the floor	25 (20)	-	-
Palms (<i>Acrocomia aculeata</i>)	21 (17)	3/21	<i>Rhodnius neglectus</i> (1 ♀, 1 ♂ and 2 nymphs of 4th stage)
Bird nests	15 (12)	-	-
Trellis of lianas	10 (8)	-	-
Rock shelters	6 (5)	-	-
Total	123	-	-

a: no triatomine showed *Trypanosoma cruzi* infection.

also reduced. Environmental parameters of the sylvatic focus of *P. megistus* showed smaller variations in T ($T = 11 \pm 1^\circ\text{C}$, max = 15°C , min = 9°C) and RU (RU = $88 \pm 4\%$, max = 95% , min = 62%) inside the breeding sites in comparison with the external conditions ($T = 12 \pm 6^\circ\text{C}$, max = 24°C , min = 4°C ; RU = $78 \pm 16\%$, max = 94% , min = 41%). This damping effect probably provides greater protection for the triatomines, especially for early nymphs, and maintains relatively high humidity. The average RH in the sylvatic site remained close to the maximum observed. Pires (2003) showed that an RH of 73% leads to optimal rates of egg hatching and nymphal moulting in *P. megistus*. Since this species originates from the humid climate of the Atlantic Forest area, dryness may be a limiting factor for the dispersal of this species in Brazil (Forattini 1980, Cortez et al. 2007). Sylvatic *P. megistus* have been found in other Brazilian states, where they are often associated with nests of *Didelphis* sp. and show a preference for arboreal habitats (Fig. 3). Although the opossums tested here were not infected, Fernandes et al. (1991, 1994) demonstrated that these reservoirs play an important role in the interaction of the parasite's domestic and sylvatic cycles in Bambuí. Wildlife reservoirs are involved in the maintenance of *T. cruzi* in the natural environment and in its dispersal to domestic environments. The low frequency of natural triatomine colonies observed in the municipality corroborates the low numbers of domiciliary colonies currently reported. The reduction in triatomine colonies in households is attributed mainly to the extensive vector control program that has been established for decades in Bambuí. However, unlike *T. infestans*, which is restricted to the household environment in Brazil, *P. megistus* has a wide distribution in nature and frequently moves

between natural ecotopes and dwellings (Dias 1982, Fernandes et al. 1994). The low rates of re-infestation (10%) and domiciliary colonies (20%) observed in residences evaluated between 2004-2009 suggest that the sylvatic environment is the main source of household recolonisation. The expansion of monocultures such as beans, corn and especially sugarcane has reduced the original vegetation in the municipality over recent decades. Such land use change has led to a reduction in the natural resources used as shelter and food by the triatomines; these resources previously supported high rates of domestic invasion (Forattini et al. 1978). In an epidemiological study in Bambuí, Fernandes et al. (1992) observed that *P. megistus* captured inside dwellings showed higher feeding preference for humans and dogs and warned that vector-borne Chagas disease in the municipality could resurge if the triatomine control program were interrupted. The data presented here suggest that even with a low rate of infestation in sylvatic habitats, the colonisation of domiciliary environments has been extensive and ongoing throughout the municipality. We conclude that an active surveillance program is necessary to contain household infestations.



Fig. 2: natural ecotope of *Panstrongylus megistus* found in the municipality of Bambuí, state of Minas Gerais, Brazil (the white arrow indicates the entrance of the hollow).



Fig. 3: map of *Panstrongylus megistus* distribution (area in gray) [modified from Carcavallo et al. (1999)] and the principal findings of sylvatic foci in different Brazilian states. 1: state of Rio Grande do Sul (hollow trees) (Santos-Jr 2007); 2: state of Santa Catarina (hollow trees and Bromeliaceae) (Leal et al. 1961, Schlempler-Jr et al. 1985, Grisard et al. 2000); 3: state of São Paulo (hollow trees, anfractuosités, bromeliads, palms and rock shelters) (Barretto et al. 1964, Barretto 1967, Forattini et al. 1970, 1977, 1978); 4: state of Rio de Janeiro (hollow trees) (Miles et al. 1982); 5: state of Minas Gerais (hollow trees, tree holes, palms and burrows in the floor) (Barretto et al. 1978, Neves 1979, Santos-Júnior et al. 2011, the present paper).

ACKNOWLEDGEMENTS

To Ronaldo M de Melo, Paulo A Lamounier, Ascânio Lamounier and Catarina Macedo, for the constant support and suggestions in field works, to Dr Christopher Schofield, for the criterious revision and suggestions for this paper, and to Christiane Santos Matos, for the personal involvement during this project.

REFERENCES

- Barretto MP, Ribeiro RD, Rocha GM 1978. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXIX: inquérito preliminar sobre triatomíneos silvestres na região do Triângulo Mineiro, MG, Brasil. *Rev Bras Biol* 38: 633-637.
- Barretto MP, Siqueira AF, Pedreira de Freitas JL 1964. Estudo sobre reservatórios e vetores do *Trypanosoma cruzi*. II – Encontro do *Panstrongylus megistus* em ecótopos silvestres no estado de São Paulo (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6: 56-63.
- Carcavallo RU, Curto de Casas SI, Sherlock IA, Galindez Girón I, Jurberg J, Galvão C, Mena Segura CA, Noireau F 1999. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. In RU Carcavallo, I Galindez Girón, J Jurberg, H Lent (eds.), *Atlas of Chagas' disease vectors in the America*, vol. III, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 747-792.
- Chagas CRJ 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Cortez MR, Avalos M, Rocha V, Gorla D 2007. Distribución biogeográfica de los triatominos in Bolivia. In MR Cortez, *Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas*, Ministerio de Salud y Deportes, Programa de Chagas, Imprenta Genesis, La Paz, p. 67-137.
- Dias E 1945. *Um ensaio de profilaxia da doença de Chagas*, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 116 pp.
- Dias E, Dias JCP 1968. Variações mensais da incidência das formas evolutivas do *Triatoma infestans* e do *Panstrongylus megistus* no município de Bambuí, estado de Minas Gerais (IIª Nota: 1951 a 1964). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 66: 209-226.
- Dias E, Pellegrino J 1948. Alguns ensaios com o "Gammexane" no combate aos transmissores da doença de Chagas. *Bras Medico* 62: 185-191.
- Dias JCP 1982. *Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil: estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982*, PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 376 pp.
- Fernandes AJ, Chiari E, Casanova C, Dias JCP, Romanha AJ 1992. The threat of reintroduction of natural transmission of Chagas' disease in Bambuí, Minas Gerais state, Brazil, due to *Panstrongylus megistus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 285-289.
- Fernandes AJ, Chiari E, Rodrigues RR, Dias JCP, Romanha AJ 1991. The importance of the opossum (*Didelphis albiventris*) as a reservoir for *Trypanosoma cruzi* in Bambuí, Minas Gerais state. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 81-85.
- Fernandes AJ, Diotaiuti L, Dias JCP, Romanha AJ, Chiari E 1994. Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Publica* 10: 473-480.
- Forattini OP 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saude Publica* 14: 265-299.
- Forattini OP, Ferreira AO, Silva EOR, Rabello EX 1978. Aspectos ecológicos da tripanosomíase americana. XII - Variação regional da tendência de *Panstrongylus megistus* à domiciliação. *Rev Saude Publica* 12: 209-233.
- Forattini OP, Ferreira OA, Silva EOR, Rabello EX 1977. Aspectos ecológicos da tripanosomíase americana. VIII - Domiciliação de *Panstrongylus megistus* e sua presença extradomiciliar. *Rev Saude Publica* 11: 73-86.
- Forattini OP, Rabello EX, Castanho MLS, Pattioli DGB 1970. Aspectos ecológicos da tripanosomíase americana. I – Observações sobre *Panstrongylus megistus* e suas relações com focos naturais da infecção em área urbana da cidade de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica* 4: 19-30.
- Grisard EC, Carvalho-Pinto CJ, Scholz AF, Toma HK, Schlemper BR Jr, Steindel M 2000. *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis marsupialis* in Santa Catarina and Arvoredo Islands, Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 795-800.
- Leal H, Ferreira Neto JA, Martins CM 1961. Dados ecológicos sobre triatomíneos silvestres na Ilha de Santa Catarina (Brasil). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 3: 213-220.
- Martins AV, Versiani V, Tupynambá AA 1942. Sobre 25 casos agudos da moléstia de Chagas observados em Minas Gerais. *Mem Inst Ezequiel Dias* 3-4: 1-6.
- Miles MA 1976. A simple method of tracking mammals and locating triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* in Amazonian forest. *Am J Trop Med Hyg* 25: 671-674.
- Miles MA, Souza AAA, Póvoa MM 1982. O ecótopo de *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae) na floresta do Horto (Rio de Janeiro). *Rev Bras Biol* 42: 31-35.
- Neves DP 1979. *Aspectos da dinâmica populacional do Panstrongylus megistus (Hemiptera, Reduviidae) em condições de campo e laboratório*, PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 121 pp.
- Noireau F, Abad-Franch F, Valente SAS, Dias-Lima A, Lopes CM, Cunha V, Valente VC, Palomeque FS, Carvalho-Pinto CJ, Sherlock I, Aguiar M, Steindel M, Grisard EC, Jurberg J 2002. Trapping Triatominae in silvatic habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 61-63.
- Pires HHR 2003. *Aspectos do comportamento do Panstrongylus megistus (Burmeister, 1835)*, PhD Thesis, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ, Rio de Janeiro, 109 pp.
- Santos-Jr JE 2007. *Avaliação da preferência alimentar e da infecção por Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909) em Panstrongylus megistus (Burmeister, 1835) num fragmento de floresta em Porto Alegre, RS*, MSc Thesis, Porto Alegre, 54 pp.
- Schlemper-Jr BR, Steindel M, Gargioni R, Farias CJM, Oliveira R, Trianon JAX 1985. Reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi* e suas relações com o domicílio humano na Ilha de Santa Catarina. *Arq Cat Med* 14: 91-96.
- Silveira AC 2000. Profilaxia. In Z Brener, Z Andrade, M Barral-Neto, *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2nd ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 75-87.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR. Chagas disease in the Amazon Region. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102 Suppl 1: 47 - 55.

Alencar JE. História Natural da Doença de Chagas no Estado do Ceará. Fortaleza (Brasil): Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará; 1987.

Almeida CE, Vinhaes MC, Almeida JR, Silveira AC, Costa J. Monitoring the Domiciliary and Peridomiciliary Invasion Process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95(6): 761 - 8.

Andrade SG. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Rev Soc Bras Med Trop 1985; 18 Suppl.1: 39 - 46.

Andrade ZA. Patologia da doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, organizadores. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 201 - 26.

Anonymous. Recommendations from a Satellite Meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94 suppl 2: 429 - 32.

Aragão MB. Climatic aspects of Chagas disease. II. Area of occurrence of *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1935). Rev Bras Malariol Doenças Tropicais 1961; 13: 171 - 93.

Barbosa SE, Diotaiuti L, Soares RPP, Pereira MH. Differences in saliva composition among three Brazilian populations *Panstrongylus megistus*. Acta Trop 1999; 72: 91 - 8.

Barbosa SE, Soares RPP, Pires HHR, Diotaiuti L. Experimental evidence for a demographic cline in *Panstrongylus megistus* populations. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(6): 773 - 5.

Barbosa SE, Belisário CJ, Souza RCM, Paula AS, Linardi PM, Romanha AJ, Diotaiuti L. Biogeography of brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleo-vegetational data. Acta Trop 2006; 99: 144 - 54.

Barbosa SE, Dujardin JP, Soares RP, Pires HH, Margonari C, Romanha AJ, Panzera F, Linardi PM, Duque-De-Melo M, Pimenta PF, Pereira MH, Diotaiuti L. Interpopulation variability among *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) from Brazil. J Med Entomol 2003; 40(4): 411 - 20.

Barr SC, Dennis VA, Klei TR. Serologic and blood culture survey of *Trypanosoma cruzi* infection in four canine populations of southern Louisiana. Am J Vet Rs 1991; 52: 570 - 3.

Barr SC, Simpson M, Schmidt SP, Bunge MM, Authement JM, Lozano F. Chronic dilatative myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* in two dogs. J Am Vet Med Assoc 1989; 195: 1237 - 40.

Barr SC. Canine Chagas` disease (American Trypanosomiasis) in North America. Vet Clin Small Anim 2009; 39: 1055 - 64.

Barretto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XVII – Contribuição para o estudo dos focos naturais da tripanossomose americana, com especial referência à região nordeste do estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1967; 1(2): 23 - 36.

Barretto MP, Ribeiro RD, Rocha GM. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXIX: Inquérito preliminar sobre triatomíneos silvestres na região do Triângulo Mineiro, MG, Brasil. Rev Brasil Biol 1978; 38(3): 633 - 7.

Barretto MP, Siqueira AF, Ferriolli Filho F, Carvalheiro JR. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XX. Infecção natural de ratos comensais, capturados em biótopos naturais e artificiais, por tripanossomos semelhantes ao *T. cruzi*. Rev Brasil Biol 1967; 27: 145-156.

Barretto MP, Siqueira AF, Pedreira de Freitas JL. 1964. Estudo sobre reservatórios e vetores do *Trypanosoma cruzi*. II – Encontro do *Panstrongylus megistus* em ecótopos silvestres no Estado de São Paulo (Hemiptera, Reduviidae). Rev Inst Med Trop São Paulo 1964; 6(2): 56 - 63.

Beltran E, Perez R. Hallazgo de *Schizotrypanum cruzi* en una rata (*Rattus norvegicus*) en la ciudad de México. Rev Inst Salubr Enferm Trop 1949; 10: 235 - 8.

Bookstein FL. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.

Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop 1973; 5: 220 - 4.

Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol 2000; 30: 35 - 44.

Burkot TR, Goodman WG, Foliart GR. Identification of mosquito bloodmeals by enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg 1981; 30: 1336–41.

Cabeza Meckert P, Laguens RP. Chronic Chagas disease in the mouse. III. Absence of concomitant immunity after repeated infections. *Medicine* 1981; 41: 543 - 8.

Camandaroba ELP, Pinheiro Lima CM, Sonia G. Oral transmission of Chagas disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop* 2002; 44(2): 97 - 103.

Carcavallo RU, Franca Rodríguez ME, Salvatella R, Curto de Casas SI, Sherlock IS, Galvão C, Rocha DS, Galíndez Girón I, Otero Arocha MA, Martínez A, da Rosa JA, Canale DM, Farr TH, Barata JMS. Hábitats e fauna relacionada. In: Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H, organizadores. Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas. Vol. II. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 1999. P. 561-619.

Cardinal MV, Reithinger R, Gürtler RE. Use of an Immunochromatographic Dipstick Test for Rapid Detection of *Trypanosoma cruzi* in Sera from Animal Reservoir Hosts. *J Clinical Microbiol* 2006; 44(8): 3005 - 7.

Castañera MB, Lauricella MA, Chuit R, Gürtler RE. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92: 671 - 83.

Catzefflis F, Richard-Hansen C, Fournierchambrillon C, Lavergne A, Vié J. Biométrie, reproduction et sympatrie chez *Didelphis marsupialis* et *Didelphis albiventris* en Guyane française (Didelphidae: Marsupialia). *Mammalia* 1997; 61(2): 231- 43.

Ceballos LA, Cardinal MV, Vazquez-Prokopec GM, Lauricella MA, Orozco MM, Cortinas R, Schijman AG, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE. Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. *Acta Trop* 2006; 98(3): 286 - 96.

Centers for Disease Control and Prevention. Parasites: American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Atlanta: CDC, 2010. Disponível em: www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html. Acesso em: 02 set. 2011.

Cerqueira R, Lemos B. Morphometric differentiation between neotropical blackeared opossums, *Didelphis marsupialis* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Mammalia* 2000; 9(2): 47 - 56.

Chagas CRJ. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909; 1: 159 - 218.

Chagas C. Sobre um trypanosomo do tatú, *Tatusia novemcincta* transmitido pela *Triatoma geniculata* Latreille, 1811. Possibilidade de ser o tatú um depositario do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior (Nota previa). *Bras Med* 1912; 26: 305-6.

Corrêa RR, Rocha e Silva EO, Schiavi A. Observações sôbre o *Panstrongylus megistus*, transmissor da moléstia de Chagas (*Hemiptera, Reduviidae*). *Arq Faculdade Hig Saude Publica Univ São Paulo* 1963; 28:165 – 74.

Costa J, Argolo AM, Felix M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 2006; 1385: 47 - 2.

Costa J, Felix M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(1): 87 - 90.

Costa LP, Patton JL. Diversidade e limites geográficos de marsupiais Brasileiros. In: Cáceres NC, Monteiro-Filho ELA, organizadores. Os marsupiais do Brasil: Biologia, ecologia e evolução. Campo Grande: Editora UFMS; 2006. P. 321 - 41.

Coura JR, Junqueira ACV, Bóia MN, Fernandes O, Bonfante C, Campos JE, Santos L, Devera R. Chagas disease in the Brazilian Amazon. IV. a new cross-sectional study. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2002; 44(3): 159-65.

Crespo JA. Ecología de la comunidad de mamíferos del Parque Nacional Iguazú, Misiones. *Rev Museo Arg Ciências Nat "B. Rivadavia", Ecol. III (2)*. Buenos Aires; 1982.

Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79(4): 513 - 5.

Dias E. Estudos sobre *Schizotrypanum cruzi* [Tese]. Rio de Janeiro (RJ): Faculdade de Medicina. Univ. do Rio de Janeiro; 1933.

Dias E. Um ensaio de profilaxia de moléstia de Chagas. Ministério da Educação e Saúde. Departamento Nacional de Saúde. Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1945.

Dias E. Variações mensais da incidência das formas evolutivas do *Triatoma infestans* e do *Panstrongylus megistus* no Município de Bambuí, Estado de Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1955; 53 (2, 3 e 4): 457- 72.

Dias E, Dias JCP. Variações mensais da incidência das formas evolutivas do *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* no município de Bambuí, Estado de Minas Gerais (IIª Nota: 1951 a 1964). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1968; 66(2): 209 - 26.

Dias E, Pellegrino J. Alguns ensaios com o gammexane no combate aos transmissores da doença de Chagas. *Bras Med* 1948; 62: 185 - 91.

Dias JCP. Chagas` disease control in Brazil: Which strategy after the attack phase? *Ann Soc Belge Med Trop* 1991; 71 Suppl. 2: 75 - 86.

Dias JCP. Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil: estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982 [Tese]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 1982.

Dias JCP, Garcia ARL. Vigilancia epidemiológica con participación comunitaria. Un programa de enfermedad de Chagas. *Rev Pan Sal Públ* 1978; 84: 533 - 44.

Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas Disease in Latin América - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 7(5): 603 - 12.

Dias JCP. The epidemiology of Chagas disease in Latin American in 2008 and the future risks for its control. In: WHO. Focus on neglected tropical infectious disease: Chagas disease a public health threat in the Americas & Beyond. Veyrier du Lac: France; 2008.

Dias JCP. Reinfestação do município de Bambuí por triatomíneos transmissores da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1965; 63(1): 107 - 19.

Dias JCP. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cad Saude Publica* 2006; 22(10): 2020 - 1.

Dias JCP. Longitudinal studies on human Chagas Disease in Bambuí, Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42 Suppl. 2: 3 - 10.

Diotaiuti L. Ecologia. In: Diotaiuti, Liléia (Org.); Oliveira, Maria Angélica de (Org.); Santos, João Paulo (Org.). Triatomíneos. Colaboradores: Alessandra Aparecida Guarneri, Ana Cristina Rena de Vitta, Bernardino Vaz de Melo Azeredo, Carlota Josefovicz Belisário, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa, João Carlos Pinto Dias e Sílvia Ermelinda Barbosa. Belo Horizonte: [s.n.], 2008. P. 112-128. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/livro_triatomineos.pdf . Acesso em: 02 set. 2011.

Duarte R. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para identificação experimental de fontes alimentares em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera: Reduviidae) [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1997.

Dujardin JP. MOME, or Morphometrics in Medical Entomology. [on line]. [s.l.]: [s.n.]. Disponível em: <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>. Acesso em: 08 fev. 2011.

Dujardin JP, Muñoz M, Chavez C, Ponce C, Moreno J, Schofield CJ. The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Med Vet Entomol* 1998; 12: 113.

Dujardin JP, Slice DE. Contributions of Morphometrics to Medical Entomology. In: Tibayrenc M. *Encyclopedia of Infectious Disease – Modern Methodologies*. Vol. 25; 2006.

Dujardin JP, Steindel M, Chavez T, Machane M, Schofield CJ. Changes in the Sexual Dimorphism of Triatominae in the Transition from Natural to Artificial Habitats *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(4): 565 - 9.

Estrada-Franco JG, Bhatia V, Diaz-Albiter H, Ochoa-Garcia L, Barbabosa A, Vazquez-Chagoyan JC, Martinez-Perez MA, Guzman-Bracho C, Garg N. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(4): 624 - 30.

Fernandes AJ, Chiari E, Casanova C, Dias JCP, Romanha AJ. The threat of reintroduction of natural transmission of Chagas` disease in Bambuí, Minas Gerais State, Brazil, due to *Panstrongylus megistus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87(2): 285 - 9.

Fernandes AJ, Chiari E, Rodrigues RB, Dias JCP, Romanha AJ. The importance of the opossum (*Didelphis albiventris*) as a reservoir for *Trypanosoma cruzi* in Bambuí, Minas Gerais state. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86 (1): 81 - 5.

Fernandes AJ, Luz ZMP, Vitor RWA, Diotaiuti L, Chiari E. Possibilidade de auto-cura em gambá (*Didelphis albiventris*) naturalmente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo 1994a; 36(5): 471 - 3.

Fernandes AJ, Diotaiuti L, Dias JCP, Romanha AJ, Chiari E. Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Cad Saude Publica 1994b; 10(4): 473 - 80.

Fernandes AJ, Diotaiuti L, Dias JCP, Romanha AJ, Chiari E. Infecção natural das glândulas anais de gambás (*Didelphis albiventris*) pelo *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí – MG. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84(1): 87 - 93.

Forattini OP. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. Rev Saude Publica 1980; 14: 265 - 99.

Forattini OP, Ferreira AO, Silva EOR, Rabello EX. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana. VIII – Domiciliação de *Panstrongylus megistus* e sua presença extradomicíliar. Rev Saude Publica 1977; 11: 73 - 86.

Forattini OP, Ferreira AO, Silva EOR, Rabello EX. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana XII – Variação Regional da tendência de *Panstrongylus megistus* à domiciliação. Rev Saude Publica 1978; 12: 209 - 33.

Forattini OP, Rabello EX, Castanho MLS, Pattoli DGB. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana. I – Observações sobre *Panstrongylus megistus* e suas relações com focos naturais da infecção em área urbana da cidade de São Paulo, Brasil. Rev Saude Publica 1970; 4(1): 19 - 30.

Forattini OP, Rabello EX, Pattoli DBG. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana IV - Mobilidade de *Triatoma arthurneivai* em seus ecótopos naturais. Rev Saude Publica 1972; 6: 183 - 7.

Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD. Ancestral genomes, sex and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog 2006; 2: 24.

Galvão C, Ângulo VM. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colômbia. Zootaxa 2006; 1241: 61 - 8.

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.

Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JM. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. Exper Parasitol 1994; 78: 287 - 93.

Gardner AL. The systematics of the genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. Spec Publ Mus Texas Tech Univ 1973; 4: 1-81.

Gardner AL. Order Didelphimorphia. In: Wilson DE, Reeder DM, organizadores. Mammal species of the world. 2nd ed. Washington (DC): Smithsonian Institution Press. 2005. P. 15 - 23.

Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95(4): 557 - 65.

Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. Parasitol 1999; 118: 375 - 82.

Grisard EC, Carvalho-Pinto CJ, Scholz AF, Toma HK, Schlemper-Jr BR, Steindel M. *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis marsupialis* in Santa Catarina and Arvoredo Islands, Southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95(6): 795 - 800.

Gürtler RE, Cécere C, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. Parasitol 2007; 134: 69 - 82.

Gürtler RE, Cécere C, Rubel DN, Petersen RM, Schweigmann NJ, Lauricella MA, Bujas M, Segura EL, Wisnivesky-Colli C. Chagas disease in north-west Argentina: infected dogs as a risk factor for the domestic transmission of *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991; 85(6): 741 - 5.

Gürtler RE, Cohen JE, Cécere MC, Chuit R. Shiting host choices of the vector of Chagas disease *Triatoma infestans* in relation to the availability of host in houses in North-west, Argentina. J Applied Ecology 1997; 34: 699 - 715.

Gürtler RE, Petersen RM, Lauricella MA, Wisnivesky-Colli C. Infectivity to the vector *Triatoma infestans* of dogs infected with *Trypanosoma cruzi* in north-west Argentina. *Ann Trop Med Parasitol* 1992; 86(2): 111 - 9.

Gürtler RE, Solarz ND, Lauricella MA, Haedo AS, Pietrokowsky S, Alberti A, Wisnivesky-Colli C. Dynamics of transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of Argentina. III - Persistence of *T. cruzi* parasitemia among canine reservoirs in a two-year follow-up. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1986; 28: 213 - 9.

Herrera L, Urdaneta-Morales S. Synanthropic rodent reservoirs of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in the Valley of Caracas, Venezuela. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1997; 39(5): 279 - 82.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades@. Brasília: IBGE, 2010. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 29 jan. 2011.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ecossistemas Brasileiros. [s.l.]: IBAMA, [s.d.]. Acessado em: 20/01/2011. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/home.htm>

Jansen AM, Santos de Pinho AP, Lisboa CV, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O. The Sylvatic Cycle of *Trypanosoma cruzi*: a Still Unsolved Puzzle. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 Suppl. 1: 203 - 4.

Kjos SA, Snowden KF, Craig TM, Lewis B, Ronald N, Olson JK. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. *Vet Parasitol* 2008; 152(3-4): 249 - 56.

Lainson R, Shaw JJ, Fraiha H, Miles MA, Draper CC. Chagas disease in the Amazon Basin: *Trypanosoma cruzi* infections in sylvatic mammals, triatomine bugs and man in the state of Pará, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; 73: 193 - 204.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33 (1): 159 - 74.

Lauricella MA, Castañera MB, Gürtler RE, Segura EL. Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) Infection in Naturally Infected Dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93(4): 501 - 7.

Leal H, Ferreira Neto JA, Martins CM. Dados ecológicos sobre triatomíneos silvestres na Ilha de Santa Catarina (Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1961; 3: 213 - 20.

Lemos B, Cerqueira R. Morphological differentiation in the White-eared opossum group (Didelphidae: *Didelphis*). *J Mammal* 2002; 83(2): 354 - 69.

Levy MZ, Bowman NM, Kawai V, Waller LA, Carpio JGC, Benzaquen EC, Gilman RH, Bern C. Periurban *Trypanosoma cruzi* – infected *Triatoma infestans*, Arequipa, Peru. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(9): 1345 - 52.

Liarte DB, Murta SM, Steindel M, Romanha AJ. *Trypanosoma cruzi*: multiplex PCR to detect and classify strains according to groups I and II. *Exp Parasitol* 2009; 123(4): 283 - 91.

Lorosa ES, Nunes IM, Vinhaes MC, Andrade RE, Jurberg J. Preferência alimentar de algumas espécies de triatomíneos capturados no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com auxílio da técnica de precipitina e grau de infectividade. *Entomol Vec* 2000; 7(2): 211 - 5.

Machado EMM, Fernandes AJ, Murta SMF, Vitor RWA, Camilo DJ, Pinheiro SW, Lopes ER, Adad SJ, Romanha AJ, Dias JCP. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. Am J Trop Med Hyg 2001; 65: 958 - 65.

Martínez E, Chávez T, Sossa D, Aranda R, Vargas B, Vidaurre P. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolívia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. Bol Inst Invest Sal Des 2007; 3(1): 1 - 11.

Martins AV, Anjos VV, Tupynambá AA. Sobre 25 casos agudos da moléstia de Chagas observados em Minas Gerais. Mem Inst Ezequiel Dias 1940; 3/4: 1 - 6.

Martins LPA, Castanho REP, Casanova C, Caravelas DT, Frias GT, Ruas-Neto AL, Rosa JA. Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae, coletados em Quaraí, Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39(2):198 - 202.

Matias A, Riva JX, Torrez M, Dujardin JP. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by its wings. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(7): 947 - 50.

Mazza S, Montana A, Benitez C, Janzi EZ. Transmisión del *Schizotripanum cruzi*, al niño por leche de la madre com enfermedad de Chagas. Mis Est Patol Reg. Argentina 1936; 28: 41 - 6.

Mello D. Roedores, marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no município de Mambaí-Goías. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev Saude Publica 1982 ; 16: 282 - 91.

Meurs KM, Anthony MA, Slater M, Miller MW. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection in dog: 11 cases (1987-1996). J Am Vet Med Assoc 1998; 15: 497 - 500.

Miles M. A simple method of tracking mammals and locating triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* in Amazonian forest. Am J Trop Med Hyg 1976; 25: 671 - 4.

Miles M, Souza AAA, Póvoa MM. O ecótopo de *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae) na floresta do Horto (Rio de Janeiro). Rev Bras Biol 1982; 42(1): 31 - 5.

Miles M, Souza AAA, Póvoa MM. Mammal tracking and nest location in Brazilian forest with an improved Spool-and-Line. J Zool London 1981; 195: 331 - 47.

Miles MA, Arias JR, Valente SAS, Naiff RD, Souza AA, Póvoa MM, Lima JN, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. Am J Trop Med Hyg 1983; 32: 1251 - 9.

Miles MA, Souza A, Póvoa M, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ. Isoenzymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature 1978; 272: 819 - 21.

Miles MA, Toyé 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 1977; 71: 217 - 25.

Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38 Supl. 3: 7 - 29.

Minter DM, Minter-Goedbloed E, Ferro Vela C. Quantitative studies with first-instar triatomines in the xenodiagnosis of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in experimentally and naturally infected hosts. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1977; 71(6): 530 - 41.

Moreno AR, Carcavallo RU. Enfoque ecológico da epidemiologia da doença de Chagas In: Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H, organizadores. Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas. Vol. III. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1999. P. 981–1016

Moreno EC, Baracho L. Vigilância epidemiológica no Programa de Controle da Doença de Chagas em Minas Gerais, Brasil (1984-1998). Cad Saude Publica 2000; 16 Suppl. 2: 113 - 6.

Motta MFD. Estudo do desenvolvimento extra-uterino de *Didelphis aurita* Wied, 1826 em cativeiro – Investigação de critérios para estimativa de idade [Dissertação]. Rio de Janeiro(RJ): Instituto Oswaldo Cruz; 1988.

Neves DP. Aspectos da dinâmica populacional do *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae) em condições de campo e laboratório [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1979.

Noireau F, Abad-Franch F, Valente SAS, Dias-Lima A, Lopes CM, Cunha V, Valente VC, Palomeque FS, Carvalho-Pinto CJ, Sherlock I, Aguilar M, Steindel M, Grisard EC, Jurberg J. Trapping Triatominae in silvatic habitats. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(1): 61 - 3.

Packchanian A. Reservoir hosts of Chagas' disease in the state of Texas. Natural infection of ninebanded armadillo (*Dasypus novemcinctus texanus*), house mouse (*Mus musculus*), opossum (*Didelphis virginiana*), and wood rats (*Neotoma micropus micropus*), with *Trypanosoma cruzi* in the state of Texas. Am J Trop Med 1942; 22: 623 - 31.

Patterson JS, Schofield CJ, Dujardin JP, Miles MA. Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with Old

Word species of *Triatoma*: evidence of New World ancestry. *Med Vet Entomol* 2001; 15(4): 443 - 51.

Pellegrino J. Distribuição e índices de infecção dos triatomíneos transmissores da doença de Chagas no sudoeste de Minas Gerais. *Rev Bras Med* 1948; 5: 555 - 66.

Pellegrino J. Novos dados sobre a distribuição de triatomíneos e sua infecção pelo *Schizotrypanum cruzi* no Estado de Minas Gerais (Brasil). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1950; 48: 639 - 67.

Pereira MH, Penido CM, Martins MS, Diotaiuti L. *Triatoma infestans* is more efficient than *Panstrongylus megistus* in obtaining blood meals on non anaesthetized mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90(6): 765 - 7.

Perlowagora-Szumlewicz A, Müller C. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 1 – Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1982; 77: 37 - 53.

Pessoa SB. Domiciliação dos triatomíneos e epidemiologia da doença de Chagas. *Arq Hig Saúde Públ* 1962; 27: 162 - 71.

Pires AS, Lira PK, Fernandes FAS, Schittini GM, Oliveira LC. Frequency of movements of small mammals among Atlantic Coastal Forest fragments in Brazil. *Biol Conservation* 2002; 108:229 - 37.

Pires HHR. Ecologia comportamental de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemíptera: Reduviidae) em laboratório [Tese]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro; 2003.

Pires HHR, Borges EC, Andrade RE, Lorosa ES, Diotaiuti L. Peridomiciliary Infestation with *Triatoma sordida* Stal,1859 in the County of Serra do Ramalho, Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94(2): 147 - 9.

Prata A. Classification of Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop 1990; 23(1): 37-42. Errata: Rev Soc Bras Med Trop 1990; 23(4): 246.

Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. Acta Trop 2002; 84: 189 - 98.

Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet 2010; 375: 1388 - 1402.

Rezende JM, Rassi A. Doença de Chagas. In: Castro LP, Cunha AS, Rezende JM. Protozooses Humanas. São Paulo, Fundo editorial Byk; 1994.

Riarte A, Sinagra A, Lauricella M, Bolomo N, Moreno M, Cossio P, Arana R, Segura EL. Chronic experimental infection by *Trypanosoma cruzi* in *Cebus apella* monkeys. Mem Inst Oswaldo Cruz 1995; 90: 733 - 40.

Ribeiro RD, Barretto MP, Camargo CA, Takeda GKF. Estudo comparativo entre a eficiência de hemoculturas e xenodiagnósticos seriados efetuados em *Didelphis* naturalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev Bras Biol 1984; 44(4): 389 - 94.

Ribeiro RD, Garcia TAR, Bonomo WC. Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas. Rev Saude Publica 1987; 21(1): 51 - 4.

Rodrigues BA, Mello GB. Contribuição ao estudo da tripanosomíase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 1942; 37: 77 - 94.

Rodrigues RG. Dinâmica populacional de duas espécies simpátricas de marsupiais didelfídeos num fragmento florestal no sul do Estado do Paraná [Dissertação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2007.

Romanha AJ. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi* [Tese]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 1982.

Roque ALR, Xavier SCC, Rocha MG, Duarte ACM, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. Am J Trop Med Hyg 2008; 79(5): 742 - 9.

Sandoval CM, Pabón E, Jurberg J, Galvão C. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa 2007; 1443: 55 - 64.

Santos CB, Ferreira AL, Leite GR, Ferreira GEM, Rodrigues AAF, Falqueto A. Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(5): 471 - 3.

Santos Jr JE. Avaliação da preferência alimentar e da infecção por *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) num fragmento de floresta em Porto Alegre, RS [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS; 2007.

Schaub GA. The effects of trypanosomatids on insects In: Dawes B, editor. *Advanced Parasitology*. London: Academic Press; 1992. P. 255 - 319.

Schlemper-Jr BR, Steindel M, Gargioni R, Farias C JM, Oliveira R, Trianon JAX. Reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi* e suas relações com o domicílio humano na Ilha de Santa Catarina. *Arq Cat Med* 1985; 14: 91 - 6.

Schweigmann N. Aspectos ecológicos de una población santiagueña de la comadreja overa (*Didelphis albiventris*) en relación con la transmission del *Trypanosoma cruzi* [Tese]. Buenos Aires: Universidade de Buenos Aires; 1994.

Schweigmann NJ, Pietrokovsky S, Bottazzi V, Conti O, Bujas MA, Wisnivesky-Colli C. Estudio de la prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en zarigüeyas (*Didelphis albiventris*) en Santiago del Estero, Argentina. *Rev Pan Salud* 1999; 6: 371 - 7.

Schweigmann NJ, Pietrokovsky S, Bottazzi V, Conti O, Wisnivesky-Colli C. Interaction between *Didelphis albiventris* and *Triatoma infestans* in relation to *Trypanosoma cruzi* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90(6): 679 - 82.

Silva RA, Bonifácio PR, Wanderley DMV. Doença de Chagas no Estado de São Paulo: comparação entre pesquisa ativa de triatomíneos em domicílios e notificação de sua presença pela população em área sob vigilância entomológica. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32(6): 653 - 59.

Silva NN, Clausell DT, Nólíbos H, Mello AL, Ossanaí J, Rapone T, Snell T. Surto epidemiológico de doença de Chagas com provável contaminação oral. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1968; 10: 265 - 76.

Silveira AC. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cad Saude Publica* 2000; 16 Suppl. 2: 35 - 42.

Silveira AC. O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. In: Silveira AC. *El Control de la Enfermedad de Chagas en los Países del Cone Sur de América. História de una Iniciativa Internacional, 1991/2001*. Brasília: OPAS; 2002. P. 15 - 43

Souza RCM, Barbosa SE, Sonoda IV, Azeredo BVM, Romanha AJ, Diotaiuti L. Population dynamics of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) in Itanhomi Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(1): 14 - 20.

Steindel M, Carvalho Pinto JC, Toma HK, Mangia RHR, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State, first report of this trypanosome in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: 73 - 9.

Steindel M, Dias Neto E, Menezes CLP, Romanha AJ, Simpson AJG. Random Amplified Polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 60: 71 - 80.

Steindel M, Pacheco LK, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, Kosmanna C, Sincero TCM, Stoco PH, Murta SMF, Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60(1): 25 - 32.

Streilein KE. Behavior, ecology and distribution of South American marsupials. In: *Mammals biology in South América*. Mares MA, Genoways HH. University of Pittsburg 1982; 6: 231 - 50.

Tibayrenc M, Ayala FJ. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* 1988; 42: 277 - 92.

Toledo MJO, Kühn 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(3): 197.

Tonn R, Telford S, Cedillos R, Gonzalez J, Otero N. Infección por tripanosomas em mamíferos silvestres de Venezuela. *Bol Direcc Malar* 1982; 22: 23 - 33.

Tyndale-Biscoe CH, Mackenzie RB. Reproduction in *Didelphis marsupialis* and *D. albiventris* in Colombia. *J Mammal* 1976; 57(2): 249 - 65.

Varejão JBM, Valle CMC. Contribuição ao estudo da distribuição geográfica do gênero *Didelphis* (Mammalia: Marsupialia) no estado de Minas Gerais, Brasil. *Lundiana* 1982; 2: 5 - 55.

Vaz VC, D'Andrea PS, Jansen AM. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol* 2007; 26: 1 - 9.

Ventura J, Salazar M, Perez-Hernandez R, Lopez-Fuster M. Morphometrics of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae) in Venezuela. *J Mammal* 2002; 83(4): 1087 - 96.

Villela MM, Souza JB, Mello VP, Azeredo BVM, Dias JCP. Vigilância entomológica da doença de Chagas na região centro-oeste de Minas Gerais, Brasil, entre os anos de 2000 e 2003. *Cad Saude Publica* 2005; 21(3): 878 - 6.

Vilella MM, Souza JMB, Melo VP, Dias JCP. Avaliação do Programa de controle da doença de Chagas em relação à presença de *Panstrongylus megistus* na região centro oeste do estado de Minas gerais, Brasil. Cad Saude Publica 2009; 25(4): 907 - 17.

Watkins R. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. J Invert Pathol 1971; 117: 59 - 66.

Xavier SC, Vaz VC, D'Andrea PS, Herrera L, Emperaire L, Alves JR, Fernandes O, Ferreira LF, Jansen AM. Mapping of the distribution of *Trypanosoma cruzi* infection among small wild mammals in a conservation unit and its surroundings (Northeast-Brazil). Parasitol Int 2007; 56(2):119 - 28.

Zéledon R, Solano G, Sáenz G, Swartzwelder JC. Wild Reservoirs 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. J Parasitol 1970; 56(1): 38.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbel DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman A. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 107: 1051 - 4.