

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**Curso de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

Dissertação de Mestrado

**ALTERAÇÕES AMBIENTAIS E RISCO DE RE-EMERGÊNCIA
DE CHAGAS NA CIDADE DO SALVADOR – BA**

-Uma abordagem da ecologia vetorial e epidemiológica-

GILMAR RIBEIRO JR

Salvador – 2012

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

**ALTERAÇÕES AMBIENTAIS E RISCO DE RE-EMERGÊNCIA DA
DOENÇA DE CHAGAS EM SALVADOR – BA**

- Uma abordagem da ecologia vetorial e epidemiológica -

GILMAR RIBEIRO JR

Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

**Dissertação apresentada ao Curso da Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
Sub área: Biotecnologia Aplicada à Saúde Pública**

Salvador – 2012

Aos meus companheiros desta vida,

Sra. Rosemar e Sr. Joeci Barreto,
Sr. Gilmar Ribeiro e Sra. Rosangela Senna,
E às minhas irmãs Flaviane, Flávia, Thais, Thiana e Stefane,
Aos quais devo minha educação e formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço por todo tempo despendido a conhecimento compartilhado pelo Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, que vem exercendo o papel de orientador; Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz, por boa parte do meu perfil como biólogo desde a graduação e ao CNPq pelo financiamento deste projeto;

Agradeço aos colegas do LPBM e LACEI – CPqGM / FIOCRUZ, pela profunda ajuda, mesmo que “silenciosa” e às vezes canalizada simplesmente como amizades, especialmente aos colegas Gustavo Silva dos Santos, Alekhine Amorim e Antônio Carlos, Sidelcina Rugieri, Kathleen Ribeiro.

Aos velhos, novos amigos e ausentes que contribuíram ou não para o meu desenvolvimento de uma forma geral. A todos os seres vivos, em especial aos insetos, coprófagos cursores de folhíço ou não, hematófagos ou não, aos quais pretendo desprender boa parte de minha atenção científica, pelo equilíbrio da Terra.

Ao meu padrasto Joeci Barreto, a quem devo minha “disciplina” nos estudos, garantida através de listas semanais de exercícios, elaborada pelo mesmo, em todas as áreas.

Não poderia deixar de agradecer aos meus tios César e Cátia pela pacífica companhia, nos últimos anos e aos quais também dedico esta pesquisa.

A minha família, por servir como porto seguro, onde pude ancorar e esclarecer minhas dúvidas, especialmente a minha “segunda” mãe, Sra. Maria das Candeias pelo constante incentivo, elogios e puxões de orelha ocasionalmente.

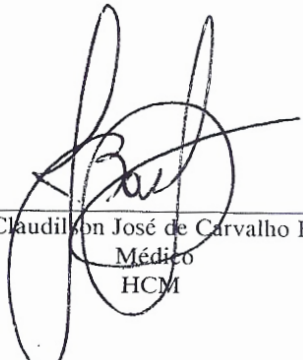
A Deus, pela OPORTUNIDADE!

“ALTERAÇÕES AMBIENTAIS E RISCO DE RE-EMERGÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS EM
SALVADOR-BA - UMA ABORDAGEM DA ECOLOGIA VETORIAL E EPIDEMIOLÓGICA.”

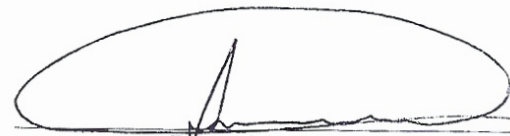
GILMAR JOSÉ DA SILVA RIBEIRO JUNIOR

FOLHA DE APROVAÇÃO


COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Claudilson José de Carvalho Bastos
Médico
HCM



Dr. José Carlos Miranda
Pesquisador Associado
CPqGM/FIOCRUZ



Dr.^a Maria Fernanda Rios Grassi
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

...nisi credideritis, non intelligentis...
(se não acredita, não entenderá)

RIBEIRO JR, Gilmar. Alterações Ambientais e Risco de Re-emergência da doença de Chagas em Salvador – BA: Uma abordagem da ecologia vetorial e epidemiológica. 50f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, BA. 2011.

RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, cujos principais vetores são hemípteros hematófagos conhecidos por “barbeiros”, constitui um grande problema de saúde pública afetando milhares de pessoas no Brasil. Na década de 1970, em pesquisas e serviço, na cidade do Salvador, BA, Brasil, foram capturados diversos triatomíneos, inclusive contaminados por *T. cruzi*, caracterizando assim o encontro destes animais como sendo um problema de longa data, no entanto, a problemática dos anos 70 foi controlada por se tratarem de espécies domiciliares, a exemplo do *Panstrongylus megistus*. Atualmente, observamos o crescente encontro do *Triatoma tibiamaculata* em residências próximas a remanescentes florestais da cidade do Salvador. Desde 2007, foram capturados no ambiente domiciliar mais de 900 exemplares do *Triatoma tibiamaculata*, até agora com uma taxa média de infecção de aproximadamente 50%, quando analisadas as fezes à fresco. O padrão de encontro destes triatomíneos no ambiente peri e intadomiciliar indica que existe o risco de peridomiciliação da espécie em alguns locais. Este fato pode estar sendo influenciado pela antropização e destruição dos fragmentos de mata da região os quais constituem seu refúgio natural. Tipagens moleculares das cepas de *T. cruzi* isoladas dos triatomíneos demonstraram que existem mais que um tipo circulante, inclusive com co-infecção de cepas no mesmo triatomíneo (*T. cruzi* I=47%; *T. cruzi* II=39%, infecção múltipla=14%; N=212). Através de técnicas moleculares foram em 212 amostras, identificamos as fontes alimentares deste triatomíneo, tendo sido demonstrado que o alimento preferencial dentre os insetos testados foram aves (45%), marsupial (35%), ruminantes (5%) e roedores (5%); O *Odds Ratio* (OR) dos triatomíneos que estavam alimentados com sangue de marsupial e que se apresentarem infectados foi de OR=1.95 (IC=1.22-3.11). Para aqueles alimentados com sangue de aves foi observado um efeito protetor contra a infecção, OR=0.43 (IC=0.30-0.73). Apesar dos resultados preliminares apontarem para o status de espécie silvestre em processo de peridomiciliação e não alimentação com sangue humano, a simples ocorrência de triatomíneos infectados no domicílio humano levanta a hipótese de risco de transmissão do mal de Chagas na cidade de Salvador por esta espécie.

RIBEIRO JR, Gilmar. Environmental Changes and Chagas' disease Risk of Re-emergence in Salvador - BA: An approach to vector ecology and epidemiology. 50f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, BA. 2012.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, whose main vectors are haematophagous bugs known as "kissing bugs", is a public health problem affecting millions of people on South America. In the 1970s, during researches and public services in Salvador city, Bahia, Brazil, several triatomines were captured, including infected by *T. cruzi*, thus characterizing the encounter of these animals as a longstanding problem, however, the problem of the 70's were controlled for being intradomiciliar species of triatomines, such as the *Panstrongylus megistus*. Currently, we observe the increasing numbers of *Triatoma tibiamaculata* encounters inside homes near to the forest remnants inside Salvador city. Since 2007, inside the home environment were captured more than 900 specimens of *Triatoma tibiamaculata* so far, with an average infection rate of approximately 50% when analyzed only the fresh feces. The pattern of these triatomines on the peri and intradomiciliar environment indicates that there is a risk of peridomiciliação species in some locations. This fact can be influenced by human disturbance and destruction of forest fragments in the region which constitutes his natural refuge. Molecular typing of strains of *T. cruzi* isolated from triatomines showed that there are more than one strain circulating, including co-infection with strains of the same triatomine (*T. cruzi* I = 47%; *T. cruzi* II = 39%, multiple infections = 14%, N = 212). Through molecular techniques were tested 212 samples to identify triatomine food sources, showing the follow results: birds (45%), marsupial (35%), ruminants (5%) and rodents (5%). The odds ratio (OR) of the insects that fed on marsupial blood and were infected was OR = 1.95 (CI = 1:22 to 3:11). For those who fed on birds blood we observed a protective effect against infection, OR = 0.43 (CI = 0.30-0.73). All the results points to the status of wild species in the process of peridomiciliação and not feed on human blood, but the mere occurrence of infected bugs in human dwellings hypothesizes risk of transmission of Chagas disease in the city of Salvador by this species.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Histórico da doença de chagas	13
2.2. Epidemiologia	13
2.3. Manifestações clínicas / Parasitológicas	15
2.4. Histórico de encontro de triatomíneos e o risco atual de transmissão da doença de chagas em Salvador, Bahia.	16
3. JUSTIFICATIVA.....	19
4. OBJETIVOS.....	20
4.1. Objetivo Geral	20
4.2. Objetivos Específicos	20
5. METODOLOGIA	21
5.1. Área de Estudo	21
5.2. Coleta de Dados e Amostras	22
5.3. Georeferenciamento das Amostras	23
5.4. Exame macroscópico e microscópio dos triatomíneos.....	24
5.5. Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase.....	24
5.6. Detecção e tipagem molecular	25
5.7. Avaliação da preferência alimentar dos triatomíneos.....	26
5.8. Eletroforese e fotografia.....	26
5.9. Análise dos resultados	27
6. RESULTADOS.....	28
7. DISCUSSÃO.....	40
8. CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem de Salvador Demonstrando Importantes Remanescentes de Mata (19°BC – 19° Batalhão de Caçadores; PMP – Parque Metropolitano de Pituacú; Alphaville® – Complexo Residencial Alphaville®; ZOO – Jardim Zôo-Botânico;). Fonte: Google Earth®, 2006.....	21
Figura 2 - Fluxograma de obtenção dos triatomíneos encontrados em Salvador entre os anos de 2007-2011. Fiocruz-BA/LPBM.	22
Figura 3 - Notificações de ocorrência de triatomíneos da cidade de Salvador-BA entre Julho de 2007 a Julho de 2011 estratificado por ambiente de notificação.	29
Figura 4 - Notificações de ocorrência de triatomíneos da cidade de Salvador entre Julho de 2007 a Julho de 2011 estratificado por ambiente de notificação e estágio evolutivo.	29
Figura 5 - Notificações de ocorrência de triatomíneos da cidade de Salvador entre Julho de 2007 a Julho de 2011 estratificados pelo mês de coleta, apresentando valores de Máxima (MAX), média (MED) e mínima (MIN).....	30
Figura 6 – Figura contendo médias de temperaturas da cidade de Salvador-BA entre os anos de 1961-1990 ao longo dos meses do ano. Fonte INMET.	30
Figura 7 - Imagem gerada através do Google Earth demonstrando os locais de ocorrência de triatomíneos na cidade de Salvador entre Junho de 2007 a junho de 2011 e a associação destes encontros e os remanescentes florestais da cidade.Fonte: Google Earth	31
Figura 8 - Geoprocessamento gráfico das notificações de triatomíneos da cidade de Salvador entre Julho de 2007 a Julho de 2011 demonstrando o número de notificações em cada lote do local de maior ocorrência.Fiocruz-BA/LPBM.....	32
Figura 9 - Geoprocessamento das notificações de triatomíneos da cidade de Salvador entre Julho de 2007 a Julho de 2011 demonstrando os triatomíneos analisados e não passíveis à análise de compressão abdominal.....	33
Figura 10 - Índice de Infecção (IIN) estratificado quanto ao estágio evolutivo dos Triatomíneos Notificados ao Centro de Controle de Zoonozes entre os meses de Junho de 2007 e Junho de 2011.FONTE:FIOCRUZ-BA/LPBM.....	34
Figura 11 - Gel de agarose a 3% demonstrando as amplificações geradas para o processo de tipagem molecular do T. cruzi em 1 e 2 de acordo o proposto por Souto (1996). Controles: Mix = T. cruzi 1 e 2; TC I = T. cruzi 1; TC II = T. cruzi 2; Triat.: Triatoma tibiamaculata; BL = H2O.....	35
Figura 12 – Figura demonstrando o resultado da detecção e tipagem molecular para o T. cruzi nos triatomíneos coletados na cidade de Salvador entre Junho de 2007 a Dezembro de 2011.	35
Figura 13 - Teste de especificidade dos primers. (A) Rato 1, (B) Rato 2, (C) Homem 1, (D) Homem 2, (E) Cão, (F) Marsupial, (G) Ave e (H) Boi.....	37
Figura 14 - Detecção de sangue de ave no conteúdo intestinal de triatomíneos ao longo do tempo em dias (DNA genômico). MW = Molecular Weight; C+ = Controle Positivo; N- = Controle Negativo; BL = H2O.	38

Figura 15 - Detecção de sangue de humano no conteúdo intestinal de triatomíneos ao longo do tempo (DNA Mitocondrial). MW = Molecular Weight; C+ = Controle Positivo; N- = Controle Negativo; BL = H2O..... 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência de triatomíneos da cidade de Salvador-BA entre Julho de 2007 a Julho de 2011 estratificado por ano de coleta e estágio evolutivo.*A partir de Julho.	28
Tabela 2 - Bairros com denúncia de triatomíneos na cidade de Salvador entre Junho de 2007 e Junho de 2011.....	32
Tabela 3 – Tabela demonstrando os animais testados para os triatomíneos notificados ao centro de controle de zoonoses de Salvador entre os anos de 2007 a 2011. Observamos ainda a especificidade taxonômica de cada um dos alvos e o alvo das ampliações. (*) Alvo inespecífico quanto à taxonomia.	36
Tabela 4 - Informações referentes a cada par de primers: nomes dos primers, táxons reconhecidos, seqüência dos primers diretos e indiretos e tamanho esperado dos produtos amplificados em pares de base (pb).....	36
Tabela 5 - Tabela demonstrando a preferência alimentar através de biologia molecular de uma amostra dos triatomíneos notificados na cidade de Salvador entre Junho de 2006 a Dezembro de 2011 e o risco relativo de ter sido alimentado em um determinado recurso e se apresentar infectado pelo T. cruzi. O.R. = Odds Ratio; NS = Não Significante; *Teste Exato de Fisher usando aproximação de Katz.....	39

1. INTRODUÇÃO

A transição demográfica da população do campo para os grandes centros urbanos acentuou o processo de favelização nas grandes metrópoles, com ocupações desordenadas, incluindo as áreas de remanescentes de mata, parques ou áreas de proteção ambiental. Estes fatores, associados às condições sanitárias insuficientes, pouca oportunidade para educação, contribuem para emergência e re-emergência de doenças parasitárias, dentre elas a doença de chagas humana (DCH) (PONDÉ, 1946; DIAS; SCHOFIELD, 1999; DIAS-LIMA, A. G.; SHERLOCK, I. A., 2000; WHO, 2000; SVS-MS, 2006).

Recentemente, e especialmente por conta do grande crescimento imobiliário da cidade de Salvador, temos observado uma forte e crescente pressão antrópica sobre os remanescentes de mata existentes na cidade. Isso aproxima a população destas áreas aos transmissores de doenças que nelas vivem. Este fato tem sido documentado e os relatos do encontro de triatomíneos em ocupações urbanas não param de crescer (DIAS-LIMA *et al.*, 1997; DIAS-LIMA, A. G.; SHERLOCK, Í., 2000). Esta situação é preocupante, pois a ocorrência de triatomíneos silvestres infectados em residências pode contribuir para ocorrência de surtos de infecção oral da doença de chagas (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991; DIAS *et al.*, 2008; ROQUE *et al.*, 2008).

Vários estudos demonstraram que a degradação ambiental causa a extinção das fontes alimentares naturais dos vetores da DCH e forçam o seu processo de domiciliação aproximando os vetores da população humana e contribuindo para a transmissão da DCH (FORATTINI *et al.*, 1977; 1978; SILVEIRA *et al.*, 1984; NASCIMENTO *et al.*, 1997; PIRES *et al.*, 1999; DIAS-LIMA, A. G.; SHERLOCK, I. A., 2000).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da doença de chagas

A Tripanossomíase Americana, mais conhecida como DCH foi descoberta por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, em 1909, na cidade de Lassance, situada na região norte do Estado de Minas Gerais. Em Lassance, Carlos Chagas coletou alguns insetos chamados “barbeiros” que estavam se alimentando de pessoas que viviam em condições precárias de habitação, mandando em seguida alguns exemplares para Oswaldo Cruz, que realizou exames e isolou o parasita. Em 14 de abril de 1909, Carlos Chagas descobriu em uma criança de dois anos de idade chamada Berenice os mesmos protozoários que havia descoberto anteriormente nos triatomíneos e em outros animais. Em seguida, discorreu sobre o agente etiológico da tripanossomíase americana, sua biologia no hospedeiro vertebrado e invertebrado, seus reservatórios e diversos aspectos da patogenia e sintomatologia da doença (CHAGAS, 1916).

2.2. Epidemiologia

A infecção por *T. cruzi* ocorre desde o extremo sul dos Estados Unidos, se estendendo por toda a América Central e do Sul (WHO, 2000). Estima-se que 18 milhões de pessoas estão infectadas por este parasita e que 40 milhões de indivíduos estão expostos ao risco de adquirir infecção em pelo menos 15 países. Em 2000, ocorreram 21 mil mortes por doença de chagas e 200 mil novos casos. No Brasil, estima-se existir aproximadamente 6.340 milhões de chagásicos com incidência de 7 mil indivíduos só em 1996 (WHO, 2000; HOTEZ *et al.*, 2012).

A média de idade da ocorrência de infecção nas áreas de intensa transmissão é aos quatro anos e 85% dessas infecções ocorrem em crianças menores de dez anos (COURA, 2007). Recentemente tem sido observada uma acentuada redução da doença de chagas chegando a cerca de 96% só no Brasil, entre crianças com 7 a 14 anos (DIAS; SCHOFIELD, 1999). Por outro lado, em vários municípios, a transmissão da doença de chagas está em pleno curso e há necessidade de

estudos para avaliar a prevalência e incidência atuais nestes locais e para implementação de estratégias mais eficazes de combate (MARTINEZ-IBARRA *et al.*, 2011; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

O *Trypanosoma cruzi* é transmitido por várias espécies de insetos triatomíneos hematófagos. Dentre as espécies de insetos-vetores transmissores da DCH no Brasil, podemos citar principalmente as seguintes: *Triatoma infestans* Klug, 1834, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma sordida* Stal, 1859, *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (SHERLOCK; GUITTON, 1974). Nos primeiros estudos realizados em áreas endêmicas na região de Minas Gerais e Bahia, observou-se que os triatomíneos viviam em florestas e de lá saíam para ocupar as casas de pau-a-pique, sem reboco e peridomicílio (PONDÉ, 1946).

Os insetos tornam-se infectados através do repasto sanguíneo em animais mamíferos e ou humanos previamente infectados com formas tripomastigotas circulantes (DIAS, 1993). Esses parasito, quando ingeridos, diferenciam-se para a forma epimastigota. Sob esta forma, aderem-se nas membranas peri-microvilares do intestino médio posterior (“midgut”) e então se multiplicam no trato digestório do triatomíneo. Com o avançar da infecção os protozoários que alcançam as paredes da ampola retal diferenciam-se para as formas tripomastigota metacíclica, infectantes para o hospedeiro vertebrado sendo eliminado pelas fezes e/ou urina quando o triatomíneo suga o sangue do vertebrado. No homem e nos outros vertebrados apresenta-se no sangue periférico sob a forma de tripomastigota e nas células dos tecidos sob a forma amastigota (DIAS, 1993).

A forma mais prevalente de transmissão da doença de chagas foi a vetorial, neste tipo de transmissão, um triatomíneo infectado, ao realizar repasto sanguíneo, evacua fezes infectadas pelo *T. cruzi* que ao penetrar na corrente sanguínea do indivíduo caracteriza a infecção. Entretanto, outras vias de transmissão são importantes, como a via transfusional, que até a década de 90 do século 20 os indivíduos se infectavam com sangue contaminado pelo *T. cruzi*, antes da triagem sorológica dos doadores (DIAS; SCHOFIELD, 1999). Atualmente, o maior risco da transmissão da doença de chagas está associado ao consumo de alimentos contaminados, como consequência da invasão de vetores peridomiciliares no

intradomicílio, levando consigo o risco da transmissão oral a exemplo do surto oral de Santa Catarina (STEINDEL *et al.*, 2008).

A prevalência de doadores de sangue com DCH no Brasil, tomando como ano-base 1978, foi de 3.1% e de acordo com os dados do Inquérito Nacional Sorológico, diminuiu para 0.9%, em 1995 (DIAS; SCHOFIELD, 1999). Dados recentes demonstraram que a prevalência em doadores da rede pública de hemoderivados, no Brasil, das diferentes regiões geográficas do Brasil foi de 0.75% 6.036 casos para 804.923 doadores (DIAS; SCHOFIELD, 1998). A prevalência de *T. cruzi* em bancos de sangue varia de 0,06%-0,49% nos EUA, 5,3% no Paraguai e maior que 5% na Bolívia (DIAS; SCHOFIELD, 1998). Vale ressaltar o aumento do número de pessoas com infecção crônica pelo *T. cruzi* nos últimos anos nos EUA, devido ao alto índice de imigrantes de países do cone sul para este país (WHO, 2000).

2.3. Manifestações clínicas e Parasitológicas

A doença de chagas humana (DCH) apresenta duas fases: aguda e crônica (WHO, 2000), de maneira sucinta, pode-se observar os seguintes padrões para cada uma destas fases:

Fase Aguda

Tem início após a infecção pelo *T. cruzi*. Nesta fase existem manifestações de doença febril, que podem persistir por até 12 semanas (SVS-MS, 2006). Nesta fase, os sinais e os sintomas podem desaparecer espontaneamente e evoluir para uma fase crônica ou progredir para formas agudas graves que podem levar ao óbito (CHAGAS, 1916). Predomina o parasito circulante na corrente sanguínea sendo, muitas vezes, com quantidade expressiva de parasitos em circulação (PINTO *et al.*, 2008).

Fase Crônica

Neste estágio existem poucos parasitas circulantes no sangue. Inicialmente é assintomática e sem sinais de comprometimento do coração e ou do sistema digestório. Pode apresentar-se como uma das seguintes formas:

- **Forma indeterminada**

O paciente se apresenta geralmente com um quadro geral assintomático e sem comprometimento do aparelho circulatório (clínica, radiografia de tórax e eletrocardiograma normais) e do aparelho digestório (avaliação clínica e radiológica normais de esôfago e cólon) (SVS-MS, 2006). A clínica deste paciente poderá continuar desta forma por toda sua vida ou tardiamente, evoluir para a forma cardíaca ou digestiva.

- **Forma cardíaca**

Em geral o coração apresenta-se aumentado de tamanho e peso, com dilatação das cavidades cardíacas, podendo apresentar aneurisma apical. A dilatação ocorre em consequência da destruição das fibras cardíacas e substituição por tecido fibroso. O acometimento cardíaco frequentemente evolui para quadros de insuficiência cardíaca congestiva e miocardiopatia dilatada. Este tipo de quadro ocorre em média de 30% dos casos crônicos relatados (SVS-MS, 2006) e é a maior responsável pela morbidade e mortalidade na doença de chagas (BOCCHI *et al.*, 2009).

- **Forma digestiva**

É caracterizado pelo acometimento do aparelho digestivo sob a forma de megacólon ou megaesôfago. Observado em cerca de 10% dos casos crônicos da doença de chagas (SVS-MS, 2006).

2.4. Histórico de encontro de triatomíneos e o risco atual de transmissão da doença de chagas na Bahia e em Salvador.

A Bahia possui em um dos seus primeiros registros sobre triatomíneos as pesquisas realizadas por Pirajá da Silva, por meados de 1911, quando o pesquisador seguindo o exemplo e as pesquisas de Carlos Chagas, identifica triatomíneos (*Conorhinus megistus* = *Panstrongylus megistus*) provenientes da cidade de Mata de São João, a 68 Km da cidade de Salvador. Após a confirmação da identificação dos insetos por Oswaldo Cruz, ainda no mesmo ano, Pirajá da Silva descreveu ainda ocorrência de triatomíneos nas cidades de Feira de Santana, Candeias, São Francisco do Conde, e na cidade de Salvador, provenientes do Asilo São João de Deus, na época localizado no Solar Bela Vista, no Bairro de Engenho Velho de Brotas, locais onde em anos seguintes, descreve o *T. cruzi* infectando estes triatomíneos (FALCÃO, 2008).

Passados quase 40 anos depois, a DCH, agora melhor conhecida por pesquisadores da região, se revelou como um sério problema de saúde pública, quando foi descrito que número elevado de triatomíneos infectados por *T. cruzi* foram capturados simultaneamente ao registro de casos autóctones da cardiopatia chagásica na cidade do Salvador, no bairro de Engenho Velho de Brotas (PONDÉ, 1946). Duas espécies de triatomíneos, *Panstrongylus megistus* Burn, 1835 e *Triatoma rubrofasciata* De Geer, 1773, foram encontradas naturalmente infectadas pelo *T. cruzi*, no centro histórico da cidade, sendo associadas aos casos humanos. O último hemíptero mencionado inclusive se encontrava infectado pelo *Trypanosoma conorhini* Donovan, 1909, parasita dos ratos domésticos (GONÇALVES, 1912; COSTA, 1955). O que motivou o médico Octávio Mangabeira Filho a coordenar junto com outros pesquisadores (COSTA, 1955) uma campanha de combate a esses vetores com inseticidas. Foi contatado, em seguida, uma acentuada redução nas populações de triatomíneos nesses locais (LEAL *et al.*, 1965). Entretanto, persistiram alguns focos infestados por *P. megistus* responsável pela infecção de várias famílias residentes nos bairros de Acupe de Brotas e Federação (SILVA, 1966).

No início da década de 1970, em um dos últimos trabalhos realizados na cidade de Salvador, foram examinados mais de 600 exemplares de *P. megistus* e *T. rubrofasciata*, dentre os quais, 16% (96 insetos) estavam infectados pelo *T. cruzi* (SHERLOCK; GUITTON, 1974). Nas últimas décadas, o *Triatoma tibiamaculata*, espécie silvestre e que tem como habitat natural os ninhos de marsupiais e roedores

(SHERLOCK; GUITTON, 1974), vem sendo considerada como uma espécie em processo de domiciliação na cidade do Salvador. (SHERLOCK; GUITTON, 1974; BARRETT, 1980).

Após 100 anos da descrição da tripanossomíase americana por Carlos Chagas e dos trabalhos de Pirajá da Silva na Bahia, os relatos de triatomíneos infectados em Salvador ainda não cessaram.

Atualmente um grande número de pessoas reside nas circunvizinhanças ou em invasões de áreas onde triatomíneos silvestres estão presentes; por exemplo, nas vizinhanças da Avenida Paralela, principalmente na área do Parque Metropolitano de Pituacú, onde está ocorrendo uma crescente urbanização, com a presença de empreendimentos habitacionais com luxuosas mansões ao lado de invasões com moradias precárias que adentram nos ecótopos naturais, aproximando assim os habitantes dos vetores silvestres do *T. cruzi*.

A destruição desses ecossistemas em estágio secundário (e muitas vezes primário) de sucessão ecológica tem causado a escassez e o desaparecimento das fontes sanguíneas naturais dos triatomíneos silvestres (DIAS-LIMA, A. G.; SHERLOCK, Í., 2000), forçando esses insetos a buscar alimentação no peri e intradomicílio, com a invasão das habitações humanas ou de seu peridomicílio por esses vetores em busca de alimentação sanguínea expondo a população humana ao risco de contrair a DCH. (DIAS; DIAS, 1979).

Alguns estudos sobre os vetores e reservatórios foram realizados por pesquisadores em diversas localidades do interior da Bahia. Porém, na capital baiana, os poucos estudos sobre os aspectos epidemiológicos e dos transmissores só foram feitos antes da década de 1980, quando ainda não se empregavam as técnicas e abordagens biomoleculares atuais (SHERLOCK *et al.*, 1987).

A pela presença dos vetores da doença de chagas na cidade de Salvador, requer atenção do sistema de vigilância em saúde para se evitar possíveis surtos de transmissão oral ou vetorial da doença de chagas nesta capital.

3. JUSTIFICATIVA

A captura de barbeiros por moradores de condomínios e por servidores do centro de controle de zoonoses de Salvador, alguns dos quais infectados pelo *T. cruzi* aponta para a necessidade de realizar pesquisas que possam determinar a distribuição, prevalência de infecção dos barbeiros e os fatores de risco associados.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a possibilidade de risco de transmissão da doença de chagas na cidade de Salvador.

4.2. Objetivos Específicos

1. Identificar as espécies de vetores da doença de chagas em remanescentes de Mata Atlântica na cidade de Salvador;
2. Verificar a taxa de infecção de vetores para o *Trypanosoma cruzi*;
3. Caracterizar as cepas de *T. cruzi* isoladas dos triatomíneos
4. Georeferenciar os possíveis locais de ocorrência do ciclo silvestre do *T. cruzi* na cidade de Salvador;
5. Detectar eventuais processos de domiciliação de espécies silvestres, avaliando o risco de infecção aos habitantes das áreas observadas;
6. Avaliar a preferência alimentar do *Triatoma tibiamaculata* capturados na cidade de Salvador;
7. Observar aspectos eco epidemiológicos de triatomíneos e suas interações com os hospedeiros no ecótopo silvestre.

5. METODOLOGIA

5.1. Área de Estudo

Este estudo foi desenvolvido em áreas da zona urbana da cidade de Salvador onde foram capturados triatomíneos em ocupações humanas ou próximo destas, vizinhas aos remanescentes florestais da cidade de Salvador, especialmente naquelas que vêm passando por pressão antrópica e ou urbanização desordenada e que temos registro do encontro de barbeiros infectados entre os meses de Julho de 2007 a Dezembro de 2011.



Figura 1 - Imagem de Salvador Demonstrando Importantes Remanescentes de Mata (19^oBC – 19^o Batalhão de Caçadores; PMP – Parque Metropolitano de Pituaçú; Alphaville® – Complexo Residencial Alphaville®; ZOO – Jardim Zôo-Botânico;). Fonte: Google Earth®, 2006.

Do ponto de vista térmico, a região do Salvador (Figura 1) apresenta temperaturas médias mensais sempre superiores a 22°C, tendo média térmica anual em torno de 25 °C. O clima da região é do tipo tropical quente e úmido sem estação

seca pronunciada, e de acordo com a classificação de Kopper o clima é do tipo Af (INMET, 2010).

5.2. Coleta de Dados e Amostras

Foram incluídas neste estudo triatomíneos provenientes de diversas localidades da cidade de Salvador entre 2007 e 2011, perfazendo um total de 4 anos e 5 meses de estudo. As amostras de triatomíneos estudadas foram obtidas segundo o fluxo definido pelo Centro de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Salvador. Todos os insetos existentes nos PITs (Pontos de Informação de Triatomíneo) da cidade de Salvador seguiam o fluxo de informação da Figura 2, abaixo.

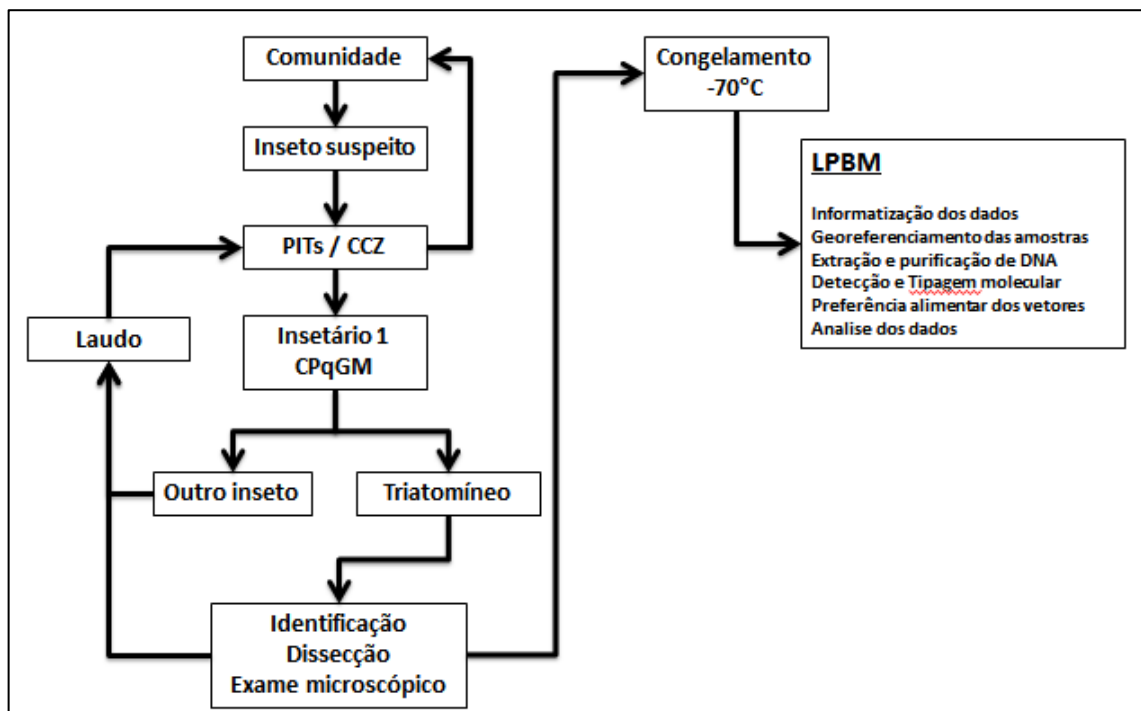


Figura 2 - Fluxograma de obtenção dos triatomíneos encontrados em Salvador entre os anos de 2007-2011.

Fiocruz-BA/LPBM.

Seguindo o programa proposto pelo Ministério da Saúde para o combate aos vetores da DCH, foram instalados Postos de Informações de Triatomíneos (PITs), nos diversos distritos sanitários de Salvador. Estes locais servem para que a

população deixe quaisquer insetos suspeitos de ser triatomíneos para exame no órgão responsável na cidade ou estado. A Fiocruz/CPqGM identificada como o local responsável pela realização dos exames para detecção do *T. cruzi* das amostras obtidas.

Cada uma das amostras obtidas tinham as informações do local de coleta, coletor e quaisquer informações posteriores informatizadas em registros individualizados em banco de dados Access 2010[®], extensão *.mdb* – Microsoft Office 2010[®] em formulário criado através do próprio software e para posterior análise. Após a informatização dos dados, cada triatomíneo foi individualizados em placas de Petri plásticas de 10x10cm com papel filtro qualitativo ao fundo e etiquetados. As análises ocorriam semanalmente às quartas-feiras e sextas-feiras a fim de evitar que os triatomíneos que chegassem vivos viessem a morrer.

5.3. Georeferenciamento das Amostras

Utilizamos o sistema de informação geográfica (SIG) do software ArcView[®] 3.2 e 9.1 (ESRI, 1999) para a visualização e determinação de quaisquer padrões dos locais de ocorrência dos triatomíneos (ESRI, 1999).

Para tornar exequível a automatização do geoprocessamento das amostras coletadas no Alphaville, foi associado previamente ao banco de dados um arquivo *.shp* (shape) de cada um dos lotes dos condomínios de casas do Alphaville, bem como de cada um dos prédios existentes e assim tomado o centroide de cada um dos lotes obtendo-se assim uma lista de coordenadas geográficas referentes a cada um dos lotes ou prédios do Alphaville. Estes dados foram associados ao banco de dados Access 2010[®] para realizar o georeferenciamento automatizado das amostras.

Nas outras localidades da cidade, a ação foi realizada de forma semelhante, com o auxílio de um arquivo *.shp* de linhas gerado pela ETC[®] correios e telégrafos contendo todas as ruas da cidade de Salvador. Com estes dados, virtualmente localizamos o ponto médio de cada uma das ruas em cada um dos bairros numa lista que também foi associada ao banco de dados das amostras. Para conseguir uma precisão ainda maior, nestas amostras retornamos fisicamente ao ponto gerado

pelo banco de dados e com o uso das outras informações digitadas no banco de dados as residências foram georeferenciadas com ajuda de GPS *in situ*.

5.4. Exame macroscópico e microscópio dos triatomíneos

Os triatomíneos foram analisados quanto ao sexo e forma evolutiva, em adultos e ninfas de 1° a 5° estágio e identificados seguindo-se a chave taxonômica existente no livro de triatomíneos (DIOTAIUTI *et al.*, 2008). Posteriormente, os triatomíneos com estrutura íntegra foram submetidos à secagem e depósito do exemplar na coleção entomológica Dr. Ítalo Sherlock, do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA.

Nos triatomíneos passíveis de análise do conteúdo intestinal foi realizada a dissecação abdominal individual e a coleta de fezes e de todo o seu conteúdo intestinal. Este material foi re-suspenso PBS (Phosphate Buffer Saline) e acondicionado em tubo de microcentrífuga com capacidade de 1,5mL autoclavados. Neste ponto, foi retirada uma gota dessa solução para o exame microscópico direto e o volume do tubo foi ajustado para 500µL para posterior congelamento em freezer à temperatura de -70°C até o momento da extração de DNA. Para o exame microscópico à fresco 20 µL deste material foi colocado entre lâmina e lamínula para pesquisa de formas evolutivas do *T. cruzi* em 50 campos microscópicos. Lâminas positivas foram fixadas em etanol absoluto, coradas pelo método *Giemsa*, identificadas e mantidas como referência. Os triatomíneos foram considerados infectados ao se observarem formas evolutivas do *T. cruzi*.

5.5. Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase

Para realizar o processo de detecção e tipagem molecular do *T. cruzi*, bem como para o processo de detecção das preferências alimentares dos triatomíneos utilizados neste estudo, foi realizado o isolamento do DNA utilizando-se o kit comercial DNAzol® (Invitrogen, CA, EUA) com modificações. Em cada tubo contendo o produto da dissecação do intestino dos triatomíneos foram adicionados

500µl do reagente DNAzol®. O homogeneizado foi centrifugado por 10min. à 12.000 RPM à 4°C para sedimentação dos *debris* celulares. A fase sobrenadante viscosa foi transferida para um tubo novo contendo 500µl de álcool P.A. A amostra foi misturada por inversão normal do tubo por alguns segundos e foi mantida no gelo por 5 minutos. O DNA foi precipitado do lisado/homogeneizado por centrifugação por 10' /12.000RPM/4°C. O sobrenadante foi removido do tubo por inversão, tomando-se cuidado para não perder o precipitado (pellet); o qual foi lavado pelo menos duas vezes com 1ml de etanol a 75%. Durante a lavagem, o precipitado foi suspenso por inversão do tubo algumas vezes. Finalmente, a amostra foi centrifugada por 10min. à 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante alcoólico foi removido por inversão do tubo e o precipitado contendo o DNA foi redissolvido em 70µL de NaOH 8mM. A concentração final do DNA de cada amostra foi quantificada no espectrofotômetro Nanodrop-1000® (Nanodrop, CA, EUA) e a concentração de DNA ajustada para cerca de 100ng/ µl e mantidas à -20°C até a realização das amplificações de DNA-alvo através da PCR. O volume final da reação de PCR foi de 25 µl contendo cerca de 100 ng/µl do DNA, 0,5 mM de cada *Primer*, 0,2 mM de dNTPs, 1X do tampão da enzima, 5,0 % de DMSO, 1-1.5 mM de MgCl₂ e 1U de enzima Taq DNA polimerase (Platinum Taq, Invitrogen, CA, EUA).

5.6. Detecção e tipagem molecular

Foram realizadas as PCRs multiplex de acordo com o proposto por Souto (SOUTO *et al.*, 1996) com *primers* específicos capazes de detectar e tipar molecularmente os isolados de *T. cruzi* utilizando-se como alvo os genes de mini-exons (mini-exon gene intergenic spacer). A tipagem molecular do *T. cruzi* como cepas de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, foi realizada como proposto pelo consenso em doença de chagas (SVS-MS, 2006).

5.7. Avaliação da preferência alimentar dos triatomíneos

Para avaliar a preferência alimentar dos triatomíneos capturados foram utilizados *primers* específicos capazes de identificar uma espécie ou um táxon. Para tanto, realizamos buscas de *primers* em outras publicações e desenho de novos *primers*, bem como a coleta de amostras de tecido em diversos animais que serviriam de controle de validação. Para o desenvolvimento dos novos *primers*, utilizamos das informações do comprimento total e parcial das sequências de DNA genômico e mitocondrial para as espécies de animais a serem avaliadas presentes no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os *primers* foram desenvolvidos com a ajuda do site <http://www.cbs.dtu.dk/services/DNAarray/probewiz.php> e de acordo com o proposto por (NIELSEN; KNUDSEN, 2002) e obtidos a partir de outras publicações (WALKER *et al.*, 2003; WALKER *et al.*, 2004).

Posteriormente, para todos os *primers* utilizados na avaliação da preferência alimentar dos triatomíneos, foi realizada padronização das condições de PCR e validação individual de cada um deles.

5.8. Eletroforese e fotografia

Para a realização da eletroforese foi utilizado 5-10µl do produto de amplificação do PCR, correndo em gel de agarose à concentração 1,5% nas PCRs simples e 3% nas PCR multiplex, corados com brometo de etídio, visualizado sob luz ultra violeta e fotografado em fotodocumentador MultiDoc-It™ (UVP, Imaging Systems – EUA). Marcadores de pares de base com 100bp (Invitrogen, EUA) foi aplicado como referência de tamanho das bandas.

5.9. Análise dos resultados

Foram realizadas análises descritivas através do pacote estatístico Epi Info 2000, V.3.5.4 (CDC, Atlanta, GE, EUA). Intervalos de confiança de 95% das estatísticas foram calculados utilizando-se o algoritmo Mid-p. Para as comparações entre proporções foi utilizado o teste de χ^2 ou o teste exato de Fisher. O teste ANOVA ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foram utilizados para comparações entre médias conforme normalidade e variância dos dados. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

Foram analisados dados referentes ao encontro de triatomíneos na cidade do Salvador correspondente ao período entre Julho de 2007 a Dezembro de 2011. Durante este período foram registradas 930 notificações (TABELA 1) de triatomíneos na cidade, em sua totalidade em áreas próximas aos remanescentes urbanos de Mata Atlântica, sejam eles em estado primário de conservação ou até mesmo em estágio de recente ação antrópica. Dentre os triatomíneos notificados, a grande maioria, 99,35% (n=924) se tratava da espécie *Triatoma tibiamaculata* e os demais, 0,65% (n=6) foram da espécie *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811).

Tabela 1 - Ocorrência de triatomíneos da cidade de Salvador-BA entre Julho de 2007 a Julho de 2011 estratificado por ano de coleta e estágio evolutivo.

	2007*	2008	2009	2010	2011	Total
Adulto	102	160	172	126	73	633
Ninfa 5° Estádio	12	42	18	7	1	80
Ninfa 4° Estádio	8	19	25	9	4	65
Ninfa 3° Estádio	19	34	13	24	8	98
Ninfa 2° Estádio	17	10	8	1	3	39
Ninfa 1° Estádio	8	4	1	1	1	15
Total	166	269	237	168	90	930

*A partir de Julho

Ao desconsiderar os dados referentes à espécie *P. geniculatus*, que representou uma fração ínfima da amostragem (0,65%), para apenas a espécie mais prevalente, foi observado o padrão do encontro destes triatomíneos predominantemente no ambiente peridomiciliar, conforme demonstrado na FIGURA 03.

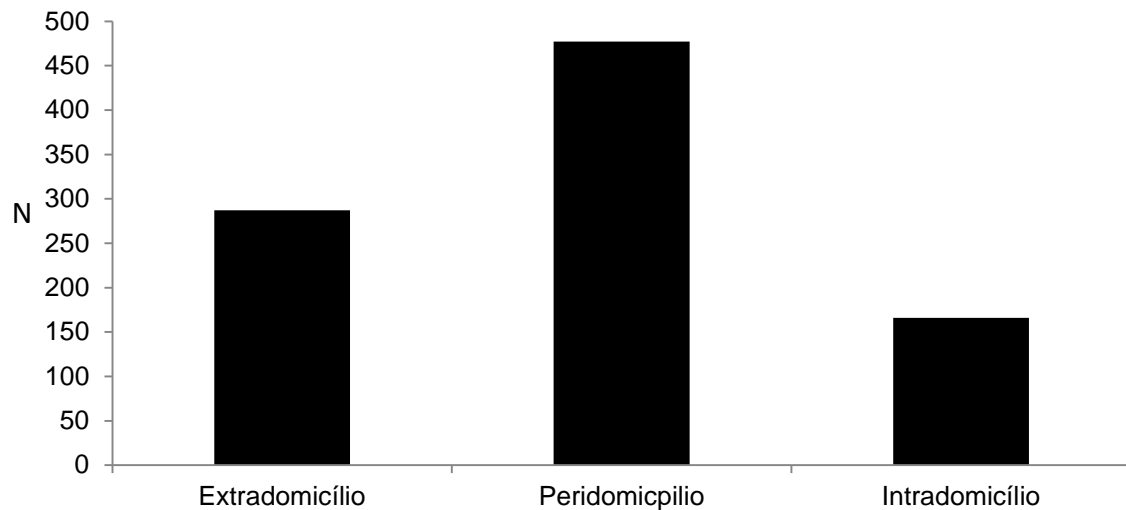


Figura 3 - Notificações de ocorrência de triatomíneos da cidade de Salvador-BA entre Julho de 2007 a Julho de 2011 estratificado por ambiente de notificação.

Ao estratificarmos estes dados pelo estágio evolutivo dos triatomíneos e ambiente de coleta (FIGURA 04) observa-se que no ambiente intradomiciliar ocorreu apenas registro de formas adultas, com raros encontros de ninfas (n=2), enquanto nos ambientes peri e extradomiciliar, observa-se a ocorrência de todos os estágios evolutivos com predominância maior, entre estes dois últimos ambientes, dos adultos no peridomicílio.

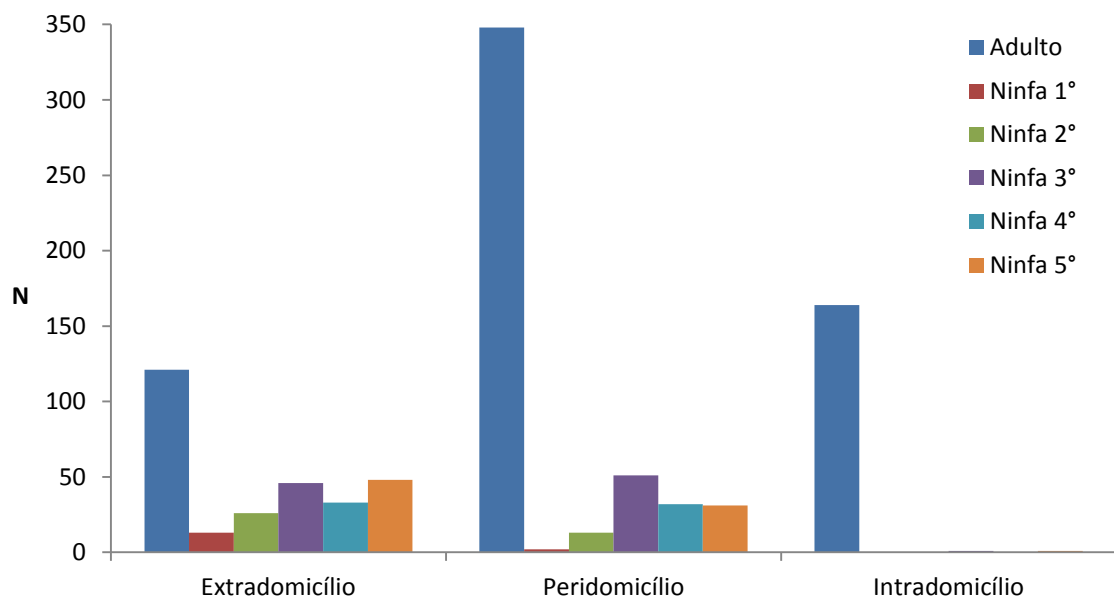


Figura 4 - Notificações de ocorrência de triatomíneos da cidade de Salvador entre Julho de 2007 a Julho de 2011 estratificado por ambiente de notificação e estágio evolutivo.

Ao analisarmos o padrão de encontro dos triatomíneos ao longo dos diferentes meses (Figura 05) verificamos que os meses onde se observou maior ocorrência foram os referentes aos meses mais quentes conforme se observa nas imagens geradas pelo Instituto Nacional de Metrologia – INMET (Figuras 06) para a cidade de Salvador-BA.

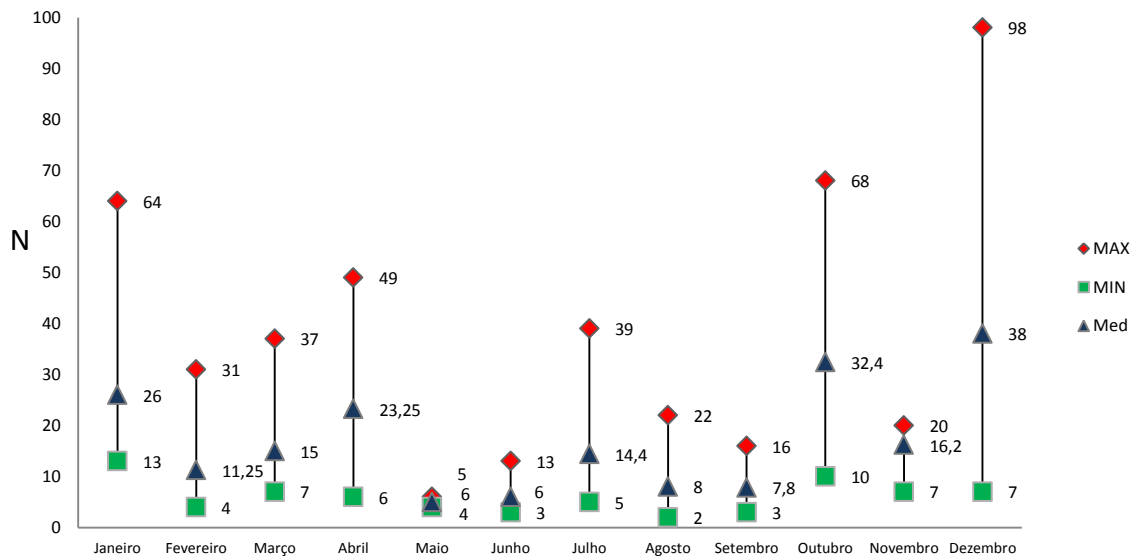


Figura 5 - Notificações de ocorrência de triatomíneos da cidade de Salvador entre Julho de 2007 a Julho de 2011 estratificados pelo mês de coleta, apresentando valores de Máxima (MAX), média (MED) e mínima (MIN).

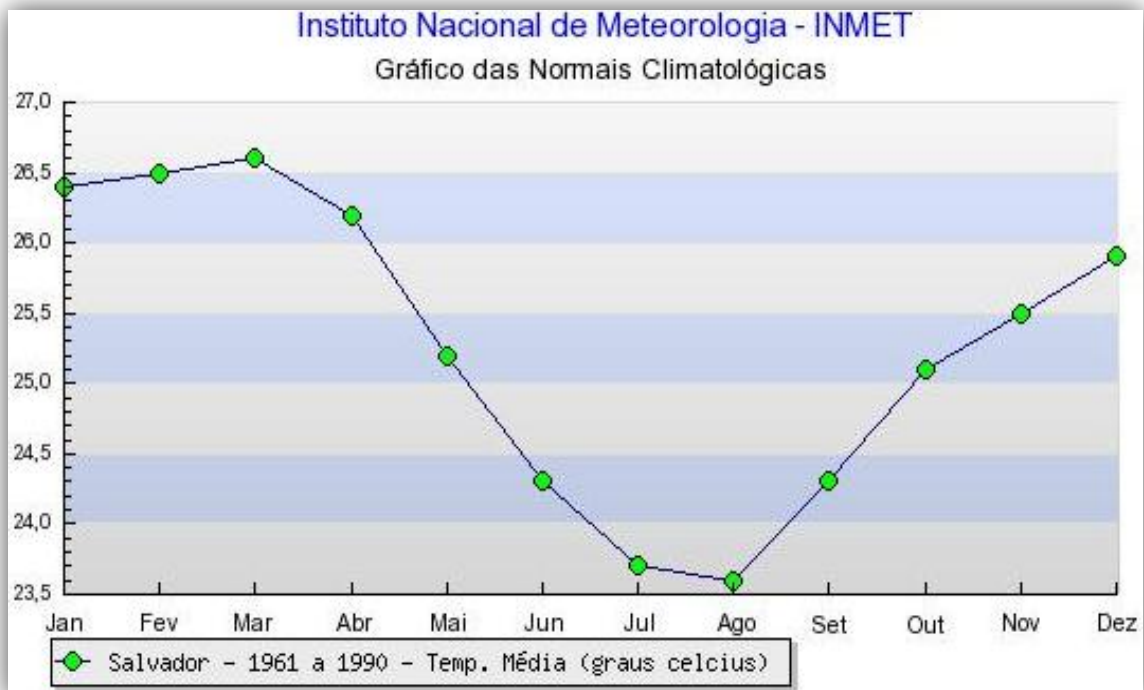


Figura 6 – Figura contendo médias de temperaturas da cidade de Salvador-BA entre os anos de 1961-1990 ao longo dos meses do ano. Fonte INMET.

Ao georeferenciar os locais de encontro dos triatomíneos a partir das informações obtidas nos laudos de notificação de triatomíneos dos PITs obteve-se êxito em 877 (94,30%) dos 930 registros estudados. Observou-se uma dispersão de ocorrências apenas nos bairros onde ainda existem remanescentes de Mata Atlântica, sejam eles primários ou em estágio secundário de regeneração conforme observado na Figura 7 e Tabela 2.

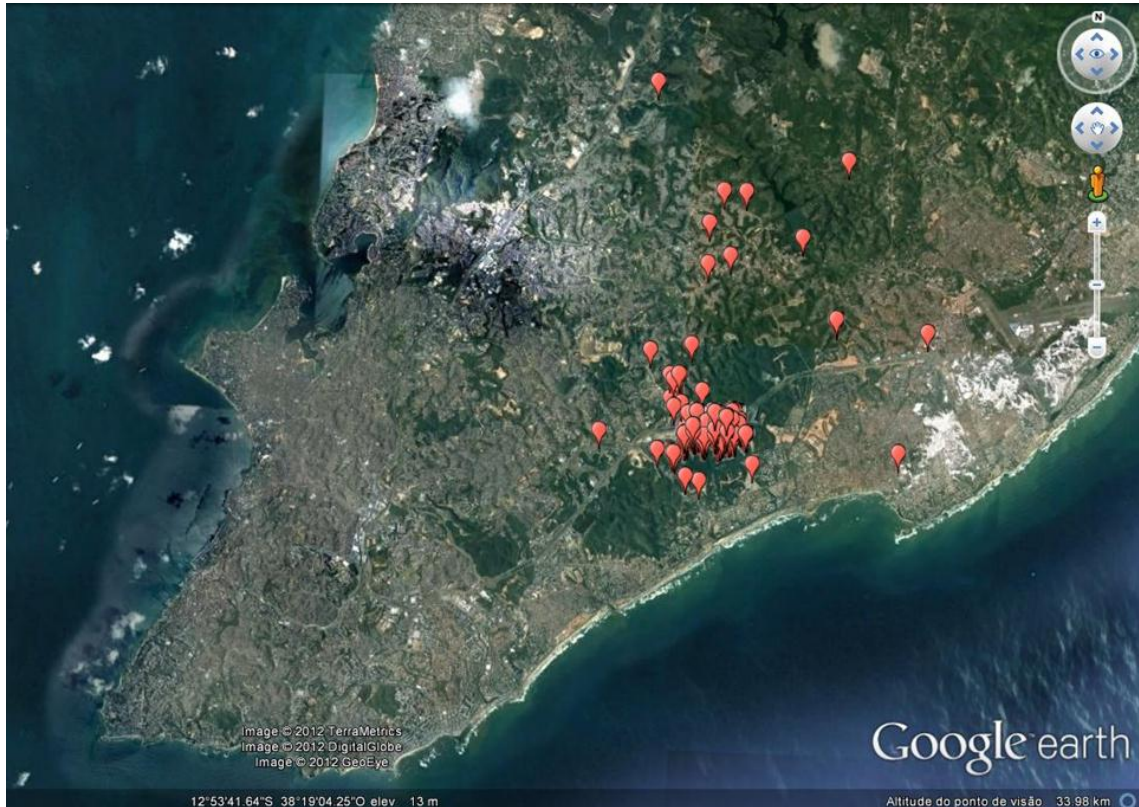


Figura 7 - Imagem gerada através do Google Earth demonstrando os locais de ocorrência de triatomíneos na cidade de Salvador entre Junho de 2007 a junho de 2011 e a associação destes encontros e os remanescentes florestais da cidade. Fonte: Google Earth

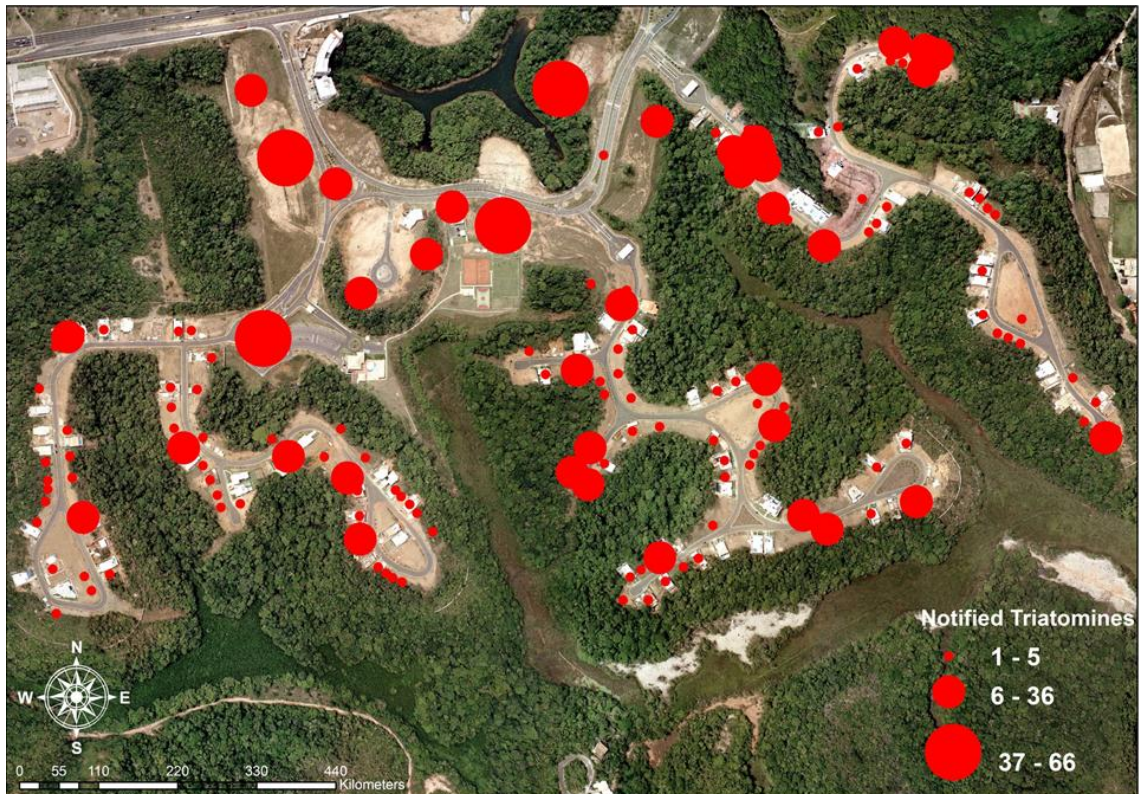


Figura 8 - Geoprocessamento gráfico das notificações de triatomíneos da cidade de Salvador entre Julho de 2007 a Julho de 2011 demonstrando o número de notificações em cada lote do local de maior ocorrência. Fiocruz-BA/LPBM.

Tabela 2 - Bairros com denúncia de triatomíneos na cidade de Salvador entre Junho de 2007 e Junho de 2011.

BAIRRO	Total	%
CANABRAVA	2	0,23%
CENTRO ADMINISTRATIVO DA BAHIA	1	0,11%
FAZENDA CASSANGE	1	0,11%
FAZENDA GRANDE I	2	0,23%
FAZENDA GRANDE II	4	0,46%
FAZENDA GRANDE IV	1	0,11%
IMBUI	1	0,11%
ITAPUÃ	1	0,11%
MUSSRUNGA II	3	0,34%
PALESTINA	1	0,11%
PATAMARES	848	96,69%
PIATÃ	1	0,11%
PITUAÇÚ	1	0,11%
SÃO CRISTÓVÃO	1	0,11%
SÃO MARCOS	1	0,11%
VALE DOS LAGOS/MATA DOS OITIS	8	0,91%
TOTAL GERAL	930	100,00%

Visualizamos que a grande maioria dos triatomíneos foi proveniente de apenas um local, o Condomínio Residencial Alphaville, localizado no bairro de Patamares (FIGURA 8).

Ao geoprocessar os locais de encontro dos triatomíneos com a sua condição de estar ou não passível à análise de compressão abdominal observou-se que praticamente todos os triatomíneos analisados foram provenientes do bairro de Patamares, especificamente de um condomínio. Tal fato reforça a hipótese de um viés de ocorrência (amostragem) destes triatomíneos (FIGURA 8 e 9) uma vez que a população local tem maior nível sócio econômico e cultural e estar mais consciente ao problema das ocorrência dos triatomíneos.

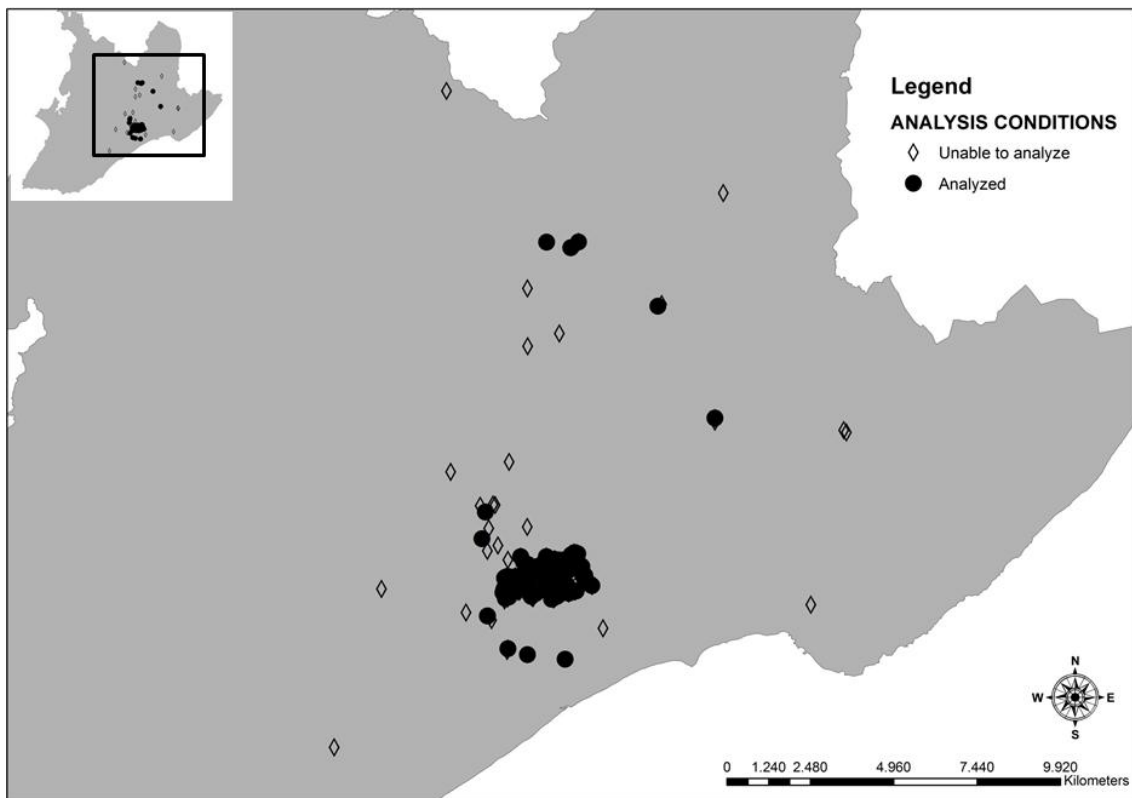


Figura 9 - Geoprocessamento das notificações de triatomíneos da cidade de Salvador entre Julho de 2007 a Julho de 2011 demonstrando os triatomíneos analisados e não passíveis à análise de compressão abdominal.

Dos 930 triatomíneos recebidos, 448 (48,00%) estavam em condições para exame de compressão abdominal e a retirada das fezes para observação de formas tripomastigotas entre lâmina e lamínula, destes, 212 (47,44%) estavam negativos, sendo assim, o índice de infecção natural (IIN) dos triatomíneos examinados através do exame microscópico foi de 52,46% (n=246). Entretanto, ao estratificarmos o IIF

pelos estádios evolutivos do inseto observamos que este índice aumenta com a idade conforme observado na Figura 10.

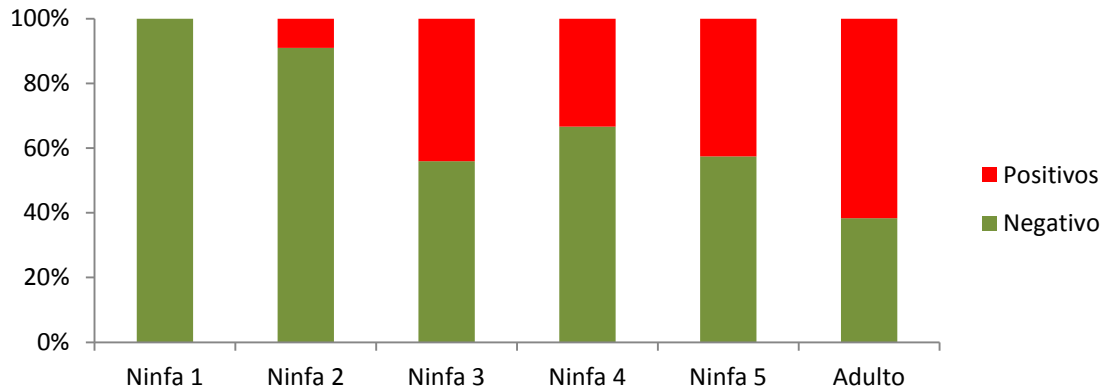


Figura 10 - Índice de Infecção (IIN) estratificado quanto ao estágio evolutivo dos Triatomíneos Notificados ao Centro de Controle de Zoonoses entre os meses de Junho de 2007 e Junho de 2011. FONTE: FIOCRUZ-BA/LPBM

Para a detecção de infecções com técnicas de biologia molecular, foram utilizados apenas os triatomíneos que estavam passíveis de análise, a fim de evitar falsos negativos. Todas as amostras analisadas anteriormente tiveram o DNA extraído e congelado. Para as análises envolvendo biologia molecular randomizamos 202 (45,29%) exemplares que tiveram as análises moleculares concluídas. O primeiro passo foi a detecção e tipagem molecular do *T. cruzi* nestas amostras. Realizamos a tipagem molecular conforme o protocolo descrito por Souto (SOUTO *et al.*, 1996). Para discriminar as linhagens do *T. cruzi* em I e II. Das 202 amostras analisadas, 62% (n=125) mostraram amplificação específica para *T. cruzi* independente da linhagem, com sensibilidade 10% maior quando comparado ao exame microscópico à fresco. Nas amostras examinadas foram detectados *T. cruzi* I em 47% (n=95) das amostras, *T. cruzi* II em 39,11% (n=79) e em 13,86% (n=28) das amostras, infecção mista com *T. cruzi* I e II.

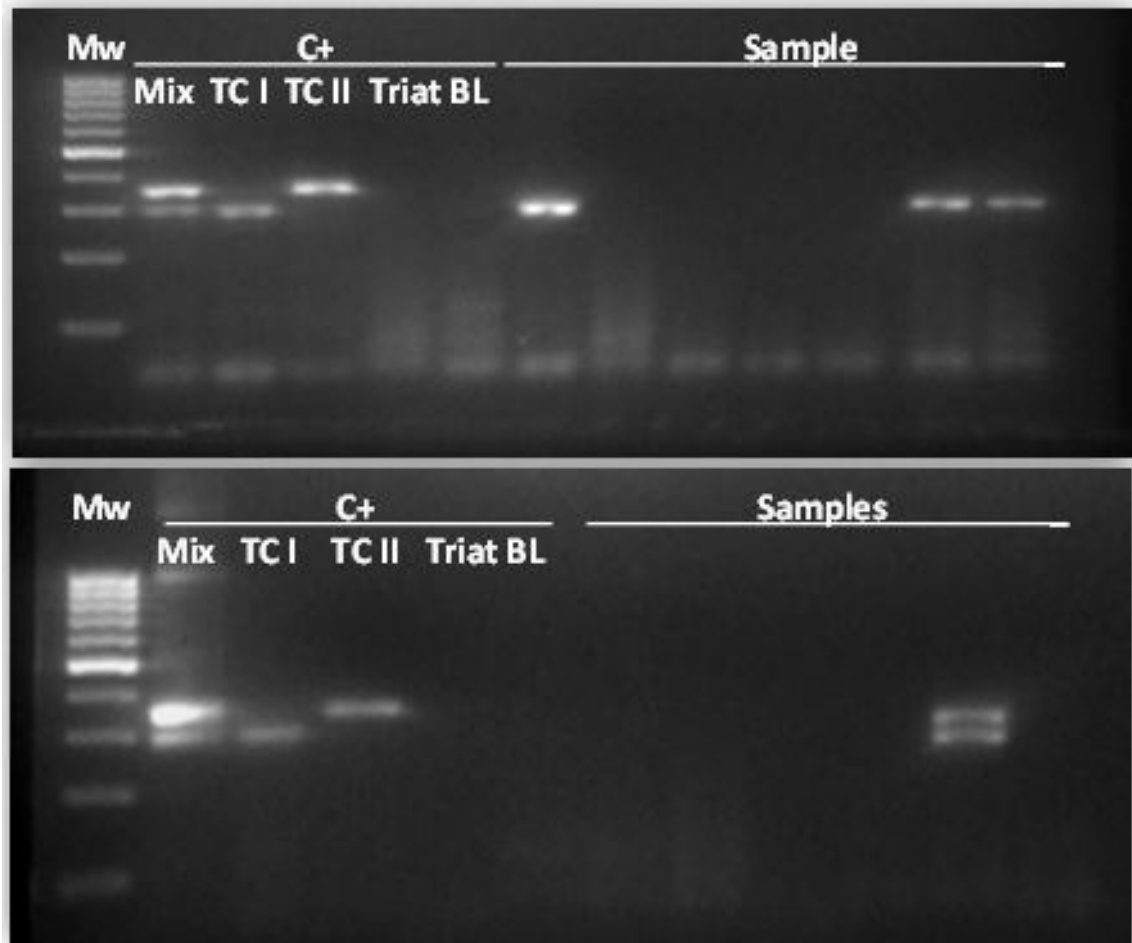


Figura 11 - Gel de agarose a 3% demonstrando as amplificações geradas para o processo de tipagem molecular do *T. cruzi* em 1 e 2 de acordo o proposto por Souto (1996). Controles: Mix = *T. cruzi* 1 e 2; TC I = *T. cruzi* 1; TC II = *T. cruzi* 2; Triat.: *Triatoma tibiamaculata*; BL = H₂O.

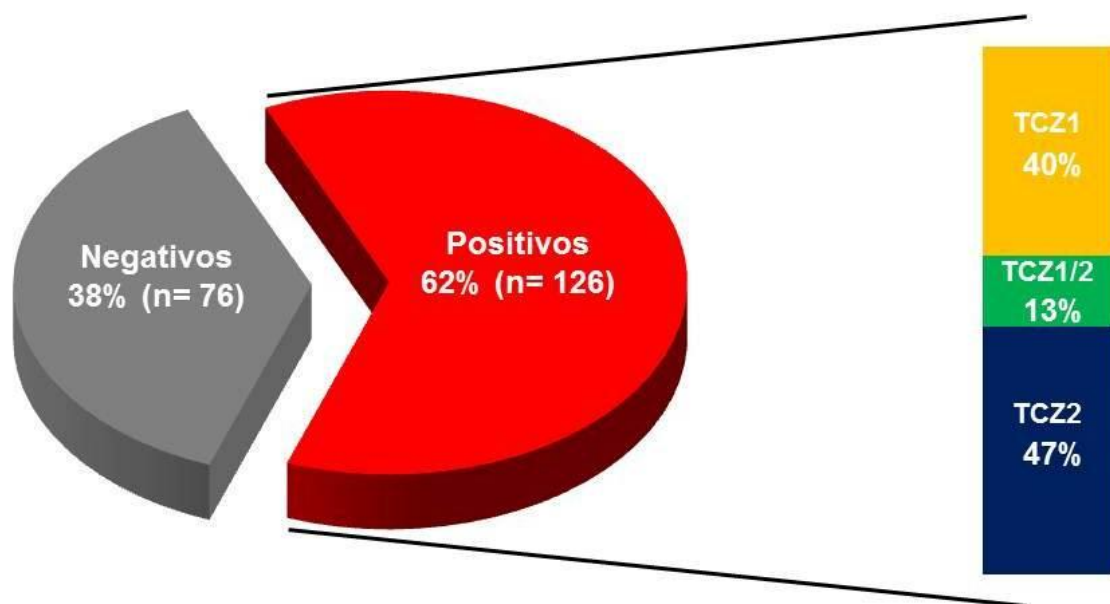


Figura 12 – Figura demonstrando o resultado da detecção e tipagem molecular para o *T. cruzi* nos triatomíneos coletados na cidade de Salvador entre Junho de 2007 a Dezembro de 2011.

O segundo passo foi realizar os testes para investigar o padrão alimentar destes triatomíneos a partir do DNA mitocondrial presente no conteúdo intestinal dos triatomíneos. Foram utilizados *primers* referidos em publicações anteriores (WALKER *et al.*, 2003; WALKER *et al.*, 2004) e *primers* desenhados a partir das informações de fragmentos de DNA obtidos no NCBI. Na Tabela 3 abaixo constam a lista de animais que investigamos como prováveis fontes alimentares do triatomíneos, sua respectiva especificidade taxonômica e o alvo para as amplificações. Os *primers* podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 3 – Tabela demonstrando os animais testados para os triatomíneos notificados ao centro de controle de zoonoses de Salvador entre os anos de 2007 a 2011. Observamos ainda a especificidade taxonômica de cada um dos alvos e o alvo das amplificações. (*) Alvo inespecífico quanto à taxonomia.

Nome	Classe	Ordem	Família	Gênero e espécie	Alvo	Número de acesso	Referência
Ave*	Aves	N/A	N/A	N/A	DNA Genômico	AC092403.4	Walker, 2004
Boi	Mamalia	Artiodactyla	Bovinae	<i>Bos taurus</i>	DNA Mintoncodrial	DQ124400.1	Walker, 2003
Cão	Mamalia	Carnivora	Canidae	<i>Canis familiaris</i>	DNA Mintoncodrial	AY729880.1	Desta dissertação
Homem1	Mamalia	Primates	Hominidae	<i>Homo sapiens</i>	DNA Mintoncodrial	AF381986.1	Desta dissertação
Homem2	Mamalia	Primates	Hominidae	<i>Homo sapiens</i>	DNA Mintoncodrial	EU095217	Desta dissertação
Marsupial	Mamalia	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphi albiventris</i>	DNA Mintoncodrial	Z29573.1	Desta dissertação
Rato1	Mamalia	Rodentia	Muridae	<i>Rattus norvegicus</i>	DNA Mintoncodrial	X14848.1	Desta dissertação
Rato2*	Mamalia	Rodentia	N/A	N/A	DNA Mintoncodrial	AC087102	Walker, 2004

Tabela 4 - Informações referentes a cada par de primers: nomes dos primers, táxons reconhecidos, sequência dos primers diretos e indiretos e tamanhos esperados dos produtos amplificados em pares de base (pb).

Nome	Táxon	Primer direto (5' - 3')	Primer indireto (5' - 3')	Tamanho (bp)
Ave*	Ave	ATAGAATGGCCTGGGTTGAAAAG	AAGTTTTTCACACAGAGGGTGGT	197
Boi	<i>Bos taurus</i>	TTTTATCCTTCCATTTATCATCATAGC	AAGAGGAAAGAATGGACTGTTTTAGAT	1261
Cão	<i>Canis familiaris</i>	GTCAATGGTTTCAGGACATATAGTTTT	TATTGTATGCACTTAGTCCTGTTTTTG	476
Homem1	<i>Homo sapiens</i>	GTAGTACATAAAAACCAATCCACATC	GTCGGATACAGTTCACCTTAGCTACC	346
Homem2	<i>Homo sapiens</i>	CACCCTATTAACCACTCACG	TGAGATTAGTAGTATGGGAG	470
Marsupial	<i>Didelphis marsupialis</i>	ACAGGATCAGAAACCTTTATCTGACTA	TTTGACTTAAAATTTATGGTTTGGTTT	253
Rato1	<i>Rattus norvegicus</i>	TATCTGTGTTATTAGACATGCACCATT	TAAAGAGGGTTTAGTTAGGAGGAAAGA	682
Rato2*	Roedores	CAAGACGGATGATCAAATGTG	ATTGGGTGGCTGTATATGTATGG	161

Em uma validação prévia, todos os *primers* foram testados contra uma série de controles para provar a sua especificidade, como demonstrado na Figura 13.

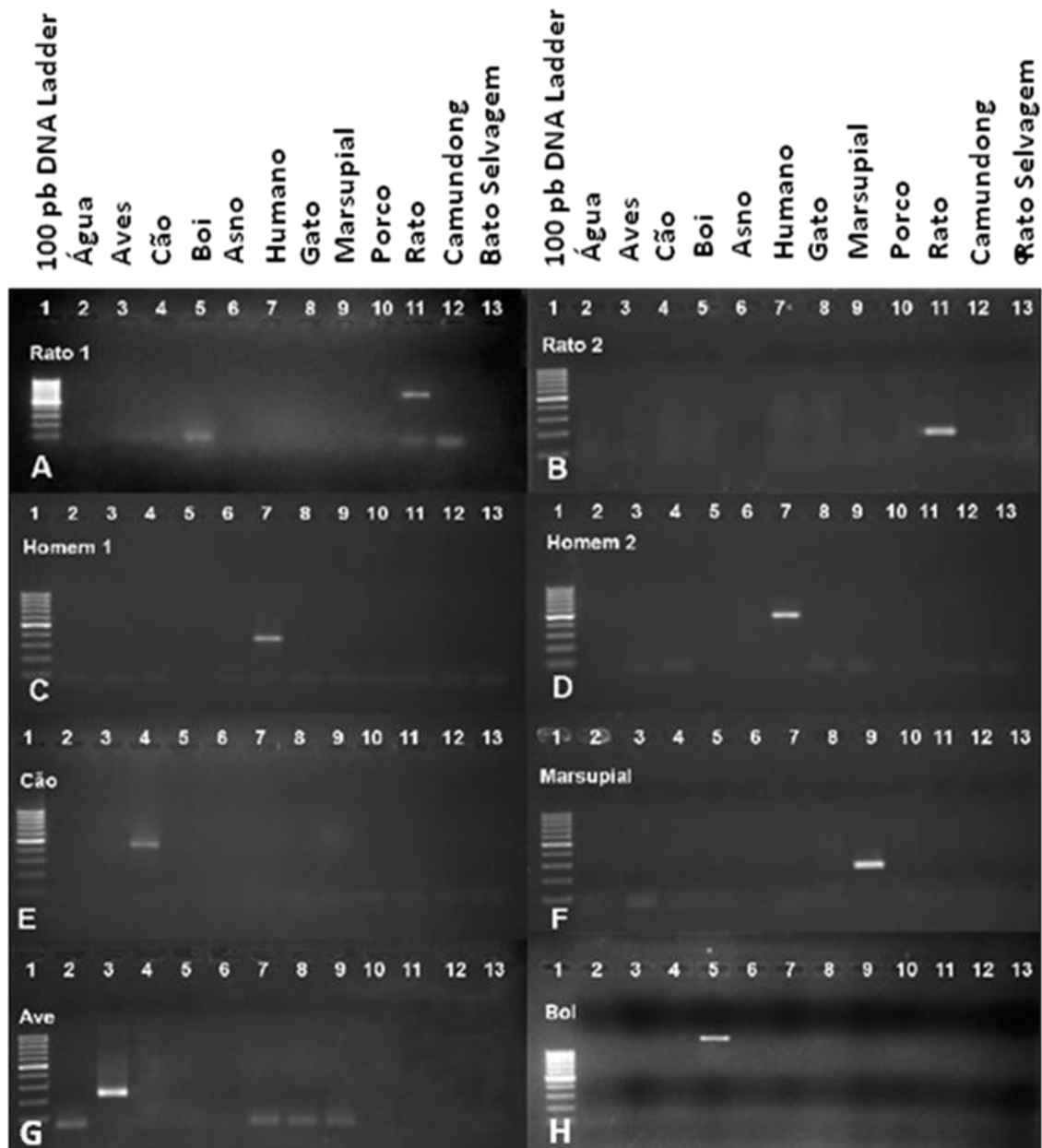


Figura 13 - Teste de especificidade dos primers. (A) Rato 1, (B) Rato 2, (C) Homem 1, (D) Homem 2, (E) Cão, (F) Marsupial, (G) Ave e (H) Boi.

Para avaliar a sensibilidade do método para detecção o DNA em alimento ingerido ao longo do tempo de digestão, foram utilizadas duas colônias de triatomíneos da espécie *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), uma alimentada apenas com o sangue humano e outra com sangue de ave, *Gallus gallus* (L.) até que os insetos alcançassem entre 3° e 4° estágio. A partir destes pontos, estas colônias não foram mais alimentadas e, periodicamente, dois triatomíneos eram retirados e

tiveram o abdômen dissecado para posterior extração de DNA e realização do teste de sensibilidade.

Obtivemos resultados diferentes para os triatomíneos que se alimentaram de aves e de sangue humanos como podemos observar nas Figuras 14 e 15 demonstrando um tempo maior de detecção do método nos triatomíneos alimentados em aves em relação aos alimentados em sangue humano.

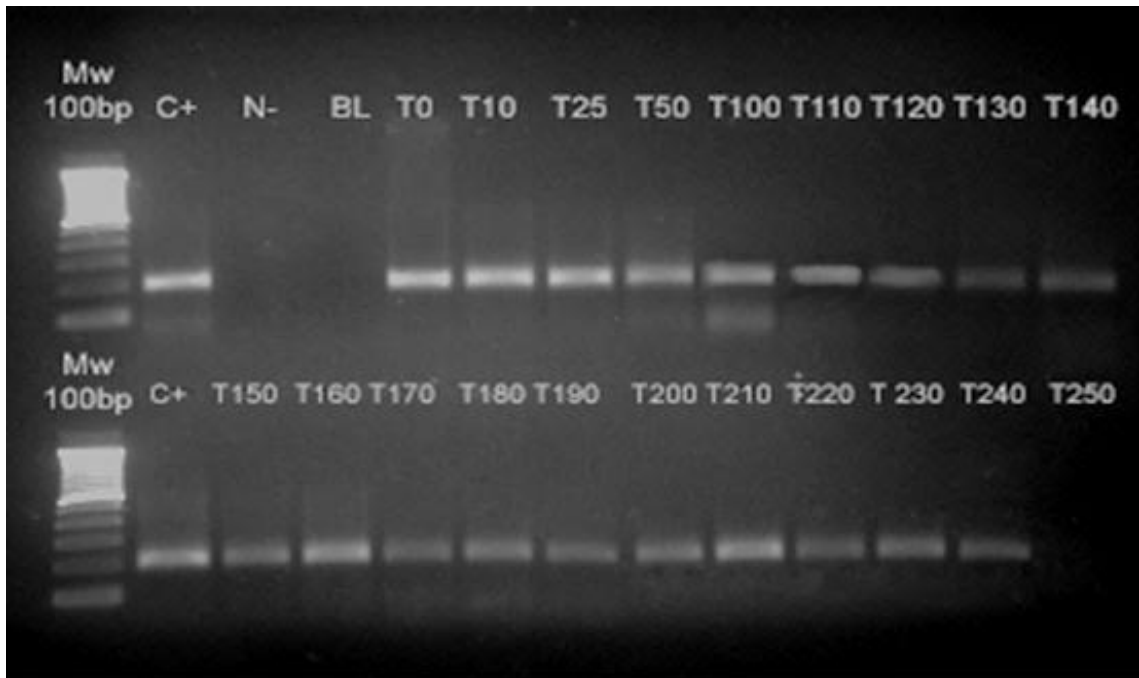


Figura 14 - Detecção de sangue de ave no conteúdo intestinal de triatomíneos ao longo do tempo em dias (DNA genômico). MW = Molecular Weight; C+ = Controle Positivo; N- = Controle Negativo; BL = H2O.

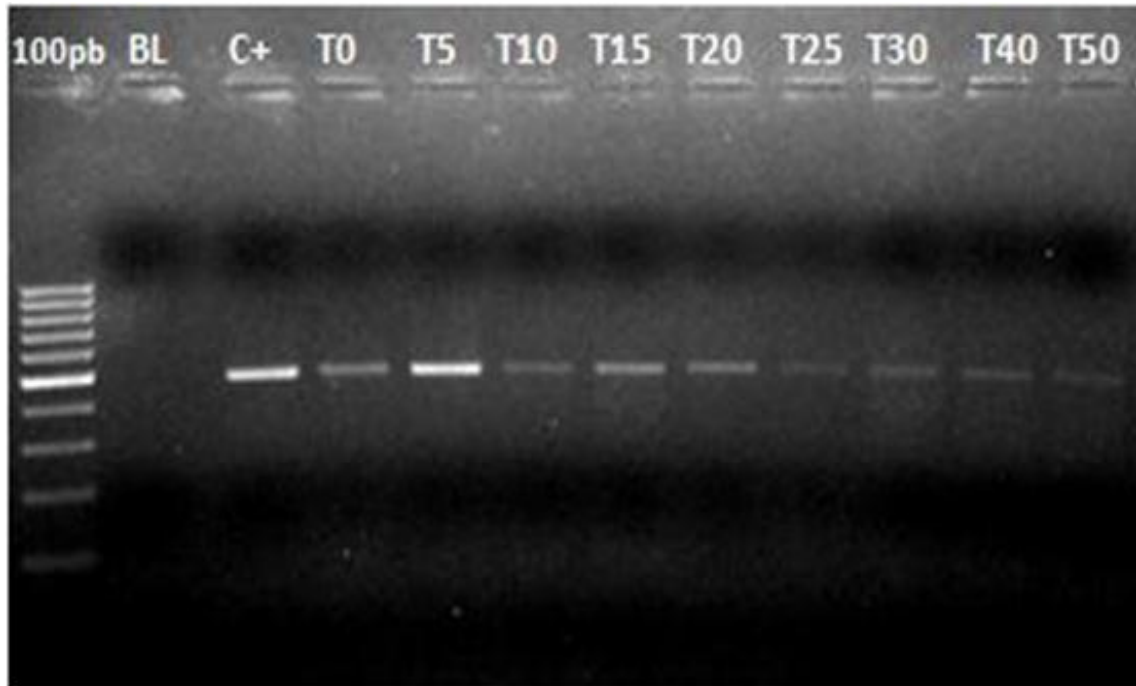


Figura 15 - Detecção de sangue de humano no conteúdo intestinal de triatomíneos ao longo do tempo (DNA Mitocondrial). MW = Molecular Weight; C+ = Controle Positivo; N- = Controle Negativo; BL = H2O.

Na Tabela 5 abaixo, pode-se observar o resultado do teste de preferência alimentar dos triatomíneos avaliados, indicando o risco do inseto ter se alimentado em um determinado animal e se apresentar infectado. Observamos uma maior preferência de alimentação em aves e marsupiais, no entanto outros perfis alimentares puderam ser observados.

Tabela 5 - Tabela demonstrando a preferência alimentar através de biologia molecular de uma amostra dos triatomíneos notificados na cidade de Salvador entre Junho de 2006 a Dezembro de 2011 e o risco relativo de ter sido alimentado em um determinado recurso e se apresentar infectado pelo *T. cruzi*.

O.R. = Odds Ratio; NS = Não Significante; *Teste Exato de Fisher usando aproximação de Katz.

Alimento	n	%	Infectado	ñ infectado	O.R. (I.C. 95%)*
Aves	95	47,03%	32	63	0.46 (0.30-0.73)
Marsupial	72	35,64%	50	22	1,95 (1.22-3.11)
Ruminantes	14	6,93%	1	13	NS
Roedores	10	4,95%	1	10	NS
Porco	2	0,99%	0	2	NS
Boi	0	0,00%	0	0	-
Cão	0	0,00%	0	0	-
Homem	0	0,00%	0	0	-
Rato	0	0,00%	0	0	-
Não amplificou	9	4,46%	5	4	NS

7. DISCUSSÃO

A presença de barbeiros infectados próximo a residências demonstra que existe o risco de transmissão vetorial da doença de chagas na cidade do Salvador.

Pelo alto número de exemplares e pelo período total do estudo, observa-se, em média, uma notificação de triatomíneo hematófago a cada dois dias, quase todos da espécie *T. tibiamaculata*. Esta espécie é silvestre, porém considerada em processo de peridomiciliação em alguns lugares do país (TAKEDA *et al.*, 1976; DIAS-LIMA, A. G.; SHERLOCK, I. A., 2000; CARVALHO *et al.*, 2003) e está associada à transmissão da doença de chagas via oral (STEINDEL *et al.*, 2008). O padrão de encontro desta espécie foi muito maior no peri e extradomicílio em relação ao intradomicílio, além disso, no intradomicílio, prevaleceram-se as formas adultas, com raras ocorrências de ninfas (apenas duas notificações), enquanto que no peri e extradomicílio, observou-se ocorrência de todos os estádios ninfais (FIGURA 04). Tal padrão de ocorrência corrobora com a ideia do processo de peridomiciliação da espécie como descrito previamente (DIAS-LIMA, A. G.; SHERLOCK, I. A., 2000).

A distribuição espacial dos insetos notificados demonstra que eles estão presentes em diversas regiões da cidade onde existem fragmentos de mata e pressão antrópica através do desmatamento parcial, fragmentação ou até mesmo ocupação total da área, como demonstrado na FIGURA 7 e na TABELA 2.

Os estudos sobre a fragmentação de florestas e o efeito sobre os vertebrados (ROBINSON *et al.*, 1992; DELANEY *et al.*, 2010) mostram que os mamíferos, a principal fonte de alimento para os triatomíneos, são os animais mais afetados pela antropização (COLLI *et al.*, 2003). Em consequência, há uma invasão das habitações, ou de seu peridomicílio por esses insetos vetores em busca de alimentação sanguínea, expondo a população humana ao risco de contrair a doença de chagas (DIAS; DIAS, 1979) ou ainda por atração das fontes luminosas locais. Estes dados estão de acordo com observações de pesquisadores, quando afirmaram que: “*A doença de chagas é doença de espaços abertos naturais ou decorrentes de ação antrópica...*”, insinuando que a tripanossomíase americana é

apenas ação reflexa das atitudes antrópicas sobre o ambiente natural (NASCIMENTO *et al.*, 1997).

Apesar das ocorrências de triatomíneos em diversos locais da cidade, a maioria deles foi proveniente do bairro de Patamares e de um único condomínio deste bairro. Este fato pode estar relacionado a existência de um PIT, local onde podem ser deixados para coleta posterior pelo CCZ. Além disso, ocorre que um maior nível educacional e socioeconômico da população local e das campanhas de conscientização realizada pelo Centro de Controle de Zoonoses na área, causando um viés de amostragem neste local e em decorrência da estrutura arquitetônica do condomínio de casas, que se entremeiam entre os fragmentos remanescentes de Mata Atlântica. Apesar de não podermos afirmar que este bairro é onde se concentra o maior número de triatomíneos na cidade, ou que não existem muitos triatomíneos nos outros bairros, o alto número de insetos vetores provenientes deste local ajuda a melhor compreender o processo de peridomiciliação do *T. tibiamaculata* como descrito nos tópicos abaixo.

Ao analisarmos o Índice de Infecção Natural (IIN) através do exame das fezes dos triatomíneos, entre lâmina e lamínula encontramos positividade em 52,56% dos exemplares. Este IIN é maior se compararmos a outros estudos (ROLON *et al.*, 2011; VILLALOBOS *et al.*, 2011), porém é inferior ao IIN encontrado em triatomíneos silvestres em outros estudos (MEDINA-TORRES *et al.*, 2010; MARTINEZ-IBARRA *et al.*, 2011), com valores superiores a 70%. Podemos verificar nas FIGURAS 04 e 10 que a grande maioria dos triatomíneos encontrados foram adultos e que a taxa de infecção dos adultos é maior que a das ninfas, contribuindo para elevar o valor da IIN. No entanto, ao se realizar a detecção molecular do *T. cruzi* em uma amostra aleatória (n=202), dentre as examinadas à fresco, conforme proposto (SOUTO *et al.*, 1996) essa taxa de infecção aumentou para 62%. Esse aumento é esperado, uma vez que a observação visual em microscópio, apesar de prática e rápida, está sempre sujeita a erros provenientes do observador.

O resultado das tipagens moleculares, de acordo com o proposto por (SOUTO *et al.*, 1996) e (SVS-MS, 2006) demonstram a presença das duas linhagens de *T. cruzi* circulante, inclusive no mesmo triatomíneo.

A validação dos primers para avaliação das fontes alimentares dos triatomíneos demonstrou que os primers avaliados foram capazes de amplificar fragmentos de DNA específico após 50 dias de repasto sanguíneo para o DNA mitocondrial (de origem humana), e depois de 240 dias, quando o alvo foi o DNA genômico das aves. Essa variação provavelmente se deve à presença de núcleo nas hemácias das aves e à quantidade de DNA existente no intestino dos triatomíneos alimentados com sangue de ave quando comparado aos insetos que se alimentaram com sangue de mamífero, cujas hemácias adultas não possuem núcleo, e o DNA alvo foi o mitocondrial.

Com os estudos para avaliar a preferência alimentar dos triatomíneos foi possível demonstrar que os triatomíneos se alimentam preferencialmente de aves e marsupiais e, em menor escala, em ruminantes e roedores, em acordo corrobora com os achados de preferência para triatomíneos silvestres (PIZARRO; STEVENS, 2008; NOIREAU *et al.*, 2009; VILLELA *et al.*, 2010; BARRETO-SANTANA *et al.*, 2011).

Nesta pesquisa foi possível associar a preferência alimentar do *T. tibiamaculata* ao risco de infecção, uma vez que cada triatomíneo analisado para verificação da preferência alimentar foi também examinado para a detecção molecular do *T. cruzi*. Foi observado que os triatomíneos que se alimentaram de aves estavam menos infectados (O.R.= 0.46 [0.30-0.73]). Tal fato se deve à característica que às aves possuem a capacidade de não se infectar pelo *T. cruzi*, enquanto, os triatomíneos que se alimentaram de marsupiais demonstraram maior risco de se infectar pelo protozoário (O.R.=1,95 [1.22-3.11]), o que apresenta plausibilidade biológica, já que os marsupiais são tidos como um dos principais reservatórios do *T. cruzi* nas Américas (DIAS, 1987). Estes resultados estão de acordo com a literatura (PIZARRO; STEVENS, 2008; NOIREAU *et al.*, 2009).

Para os outros animais analisados pelo teste de preferência alimentar não foi possível estabelecer uma correlação estatística, dado que o numero de triatomíneos

alimentados desta fonte natural foi baixa. É interessante citar que 5% das amostras não amplificaram para nenhum animal testado, demonstrando a necessidade do desenvolvimento de novos *primers* com novos alvos, e.g. morcegos, que são um importante reservatório de trypanossomatídeos e fonte alimentar de uma série de triatomíneos.

Finalmente, pelos dados apresentados acima, constatamos que em algumas regiões da cidade de Salvador existe o risco da transmissão da doença de chagas, pela via oral ou até mesmo vetorial nas áreas com risco de domiciliação dos triatomíneos.

8. CONCLUSÕES

Foi possível determinar que existe o risco de transmissão da doença de chagas humana na cidade de Salvador considerando que:

- Mais de 900 triatomíneos foram notificados no período do estudo.
- Existe uma associação entre as áreas de ocorrência de triatomíneos e antropização de fragmentos de mata local;
- A presença dos triatomíneos oriundos do peridomicílio, nos leva acreditar em possibilidade de peridomiciliação da espécie em questão em áreas mais propícias.
- O índice de infecção natural (IIN) cresce à medida que os triatomíneos evoluem para o estágio de adulto;
- Cerca de 50% dos triatomíneos passíveis de análise estavam infectados pelo *T. cruzi*;
- Presença de ambas linhagens de *T. cruzi* circulando, inclusive no mesmo vetor.
- A avaliação das preferências alimentares revelam padrões compatíveis com a peridomiciliação de vetores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETO-SANTANA, D., J. STARLING, R. GURGEL-GONCALVES & C. A. CUBA. [Comparative biology and feeding behavior of *Rhodnius neglectus* and *Rhodnius robustus* (Triatominae) under laboratory conditions]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.44, n.4, Jul-Aug, p.490-5. 2011.

BARRETT, T. V., R. H. HOFF, MOTT, K.E.;, M. A. MILES, D. G. GODFREY, R. TEIXEIRA, SOUZA, J.A.A.; & I. A. SHERLOCK. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, n.1, p.84-90. 1980.

CARVALHO, M. E., R. A. DA SILVA, J. M. BARATA, F. DOMINGOS MDE, R. M. CIARAVOLO & F. ZACHARIAS. [Chagas' disease in the southern coastal region of Brazil]. **Rev Saude Publica**, v.37, n.1, Feb, p.49-58. 2003.

CHAGAS, C. Chagas C. Tripanosomiase americana: Forma aguda da molestia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.8, p.37-60. 1916.

COLLI, G. R., G. M. ACCACIO, Y. ANTONINI, R. CONSTANTINO, E. V. FRANCESCHINELLI, R. R. LAPS, A. O. SCARIOT, M. V. VIEIRA & H. C. WIEDERHECKER. A fragmentação dos ecossistemas e a biodiversidade brasileira: uma síntese. In: D. M. Rambaldi e D. a. S. D. Oliveira (Ed.). **Fragmentação de Ecossistemas. Causas, Efeitos sobre a Biodiversidade e Recomendações de Políticas Públicas**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2003. A fragmentação dos ecossistemas e a biodiversidade brasileira: uma síntese, p.415

COSTA, A. L. Triatomíneos e tripanosomas por eles veiculados em zona central da cidade do Salvador – Bahia

(Tese). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Estado da Bahia, Salvador, 1955. 81 p.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102 Suppl 1, Oct 30, p.113-22. 2007.

DELANEY, K. S., S. P. RILEY & R. N. FISHER. A rapid, strong, and convergent genetic response to urban habitat fragmentation in four divergent and widespread vertebrates. **PLoS One**, v.5, n.9. 2010.

DIAS-LIMA, A. G., H. MAIA & I. A. SHERLOCK. A presença de *Triatoma tibiamaculata* (Hemiptera, Reduviidae) e o Risco de Ocorrência da Doença de

Chagas em Salvador, Bahia. **XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA**, p.45. 1997.

DIAS-LIMA, A. G. & Í. SHERLOCK. A Sylvatic Vectors Invading Houses and the Risk of Emergence of Cases of Chagas Disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.5, p.611-613. 2000.

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

DIAS, B. A., C. JARDIM, A. HOVNANIAN, C. J. FERNANDES & R. SOUZA. [Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: diagnostic limitations]. **J Bras Pneumol**, v.34, n.7, Jul, p.532-6. 2008.

DIAS, E. C. [Development and current aspects of occupational health in Brazil]. **Bol Oficina Sanit Panam**, v.115, n.3, Sep, p.202-14. 1993.

DIAS, J. C. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitol Today**, v.3, n.11, Nov, p.336-41. 1987.

DIAS, J. C. & C. J. SCHOFIELD. [The control of the transmission by transfusion of Chagas' disease in the Southern Cone Initiative]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.31, n.4, Jul-Aug, p.373-83. 1998.

DIAS, J. C. P. & B. DIAS. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. **Ci. e Cult.**, v.31, p.105-118. 1979.

DIAS, J. C. P. & C. J. SCHOFIELD. The evolution of Chagas Disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.1, p.103-121. 1999.

DIOTAIUTI, L., M. A. D. OLIVEIRA & J. P. D. SANTOS. **Triatomíneos**. Belo Horizonte: Ed. Fiocruz, v.1. 2008. 271 p.

ESRI. ArcView GIS 3.2a. Environmental Systems Research Institute. I. N. York 1999.

FALCÃO, E. D. C. **Pirajá da Silva: o incontestável descobridor do Schistosoma Mansoni / Piraja da Silva: the undisputed finder of Schistosoma Mansoni**. Brasília: Ministério da saúde, v.1. 2008. 314 p.

HOTEZ, P. J., E. DUMONTEIL, L. WOC-COLBURN, J. A. SERPA, S. BEZEK, M. S. EDWARDS, C. J. HALLMARK, L. W. MUSSELWHITE, B. J. FLINK & M. E. BOTTAZZI. Chagas disease: "the new HIV/AIDS of the Americas". **PLoS Negl Trop Dis**, v.6, n.5, May, p.e1498. 2012.

LEAL, J. M., I. A. SHERLOCK & E. M. SERAFIM. Observações Sobre o Combate aos Triatomíneos Domiciliários com BHC, em Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Doenças Tropicais**, v.17, n.1, p.65-73. 1965.

MARTINEZ-IBARRA, J. A., I. VALENCIA-NAVARRO, S. LEON-SAUCEDO, G. IBANEZ-CERVANTES, R. BUSTOS-SALDANA, O. D. MONTANEZ-VALDEZ, O. I. CERVANTES DIAZ & B. NOGUEDA-TORRES. Distribution and infection of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma cruzi* in the state of Michoacan, Mexico. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.106, n.4, Jun, p.445-50. 2011.

MEDINA-TORRES, I., J. C. VAZQUEZ-CHAGOYAN, R. I. RODRIGUEZ-VIVAS & R. M. DE OCA-JIMENEZ. Risk factors associated with triatomines and its infection with *Trypanosoma cruzi* in rural communities from the southern region of the State of Mexico, Mexico. **Am J Trop Med Hyg**, v.82, n.1, Jan, p.49-54. 2010.

NASCIMENTO, C., A. M. MARASSA, I. CURADO & R. M. PIAZZA. [The finding of *Panstrongylus megistus* in an artificial ecotope: taking up residence or merely visiting?]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.30, n.4, Jul-Aug, p.333-6. 1997.

NIELSEN, H. B. & S. KNUDSEN. Avoiding cross hybridization by choosing nonredundant targets on cDNA arrays. **Bioinformatics**, v.18, n.2, Feb, p.321-2. 2002.

NOIREAU, F., P. DIOSQUE & A. M. JANSEN. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Vet Res**, v.40, n.2, Mar-Apr, p.26. 2009.

PIZARRO, J. C. & L. STEVENS. A new method for forensic DNA analysis of the blood meal in chagas disease vectors demonstrated using *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. **PLoS One**, v.3, n.10, p.e3585. 2008.

PONDÉ, A. A Doença de Chagas na Bahia. **Arquivo da Universidade da Bahia**, v.1, p.333-456. 1946.

ROBINSON, G. R., R. D. HOLT, M. S. GAINES, S. P. HAMBURG, M. L. JOHNSON, H. S. FITCH & E. A. MARTINKO. Diverse and contrasting effects of habitat fragmentation. **Science**, v.257, n.5069, Jul 24, p.524-6. 1992.

ROLON, M., M. C. VEGA, F. ROMAN, A. GOMEZ & A. ROJAS DE ARIAS. First report of colonies of sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Paraguayan Chaco, using a trained dog. **PLoS Negl Trop Dis**, v.5, n.5, p.e1026. 2011.

ROQUE, A. L., S. C. XAVIER, M. G. DA ROCHA, A. C. DUARTE, P. S. D'ANDREA & A. M. JANSEN. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. **Am J Trop Med Hyg**, v.79, n.5, Nov, p.742-9. 2008.

SHERLOCK, I. A. & E. N. GUITTON. Fauna Triatominae do Estado da Bahia, Brasil. III - Notas Sobre Ecótopos Silvestres e o Gênero *Psammolestes*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 72, n.1/2, p.91-101. 1974.

SHERLOCK, I. A., J. C. MIRANDA & M. SADIGURSKY. Positividade do Xenodiagnóstico em *Didelphis albiventris*, em Duas Áreas com Diferentes Tipos de Endemicidade para o *Trypanosoma cruzi*. X Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia: Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1987. 245 p.

SHIKANAI-YASUDA, M. A., C. BRISOLA MARCONDES, L. A. GUEDES, G. S. SIQUEIRA, A. A. BARONE, J. C. P. DIAS, V. AMATO NETO, J. E. TOLEZANO, B. A. PERES, E. R. ARRUDA JR., M. H. LOPES, M. SHIROMA & E. CHAPADEIRO. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.33, p.351-357. 1991.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. & N. B. CARVALHO. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v.54, n.6, Mar, p.845-52. 2012.

SILVA, G. R. Doença de Chagas em Famílias de Duas Áreas Restritas da Cidade do Salvador, Bahia. (Tese). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1966. 143 p.

SOUTO, R. P., O. FERNANDES, A. M. MACEDO, D. A. CAMPBELL & B. ZINGALES. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v.83, n.2, Dec 20, p.141-52. 1996.

STEINDEL, M., L. KRAMER PACHECO, D. SCHOLL, M. SOARES, M. H. DE MORAES, I. EGER, C. KOSMANN, T. C. SINCERO, P. H. STOCO, S. M. MURTA, C. J. DE CARVALHO-PINTO & E. C. GRISARD. 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**, v.60, n.1, Jan, p.25-32. 2008.

SVS-MS. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.Suppl III, p.1-29. 2006.

TAKEDA, G. K., F. E. MOREIRA, T. D. REAES & L. S. CASTANHO. [1st finding of *Triatoma tibiamaculata* Pinto, 1926 naturally infected by *Trypanosoma cruzi* in Ubatuba, Sao Paulo, Brazil]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.18, n.6, Nov-Dec, p.402-9. 1976.

VILLALOBOS, G., F. MARTINEZ-HERNANDEZ, P. DE LA TORRE, J. P. LACLETTE & B. ESPINOZA. Entomological indices, feeding sources, and molecular identification of *Triatoma phyllosoma* (Hemiptera: Reduviidae) one of the main vectors of Chagas disease in the Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, Mexico. **Am J Trop Med Hyg**, v.85, n.3, Sep, p.490-7. 2011.

VILLELA, M. M., V. L. RODRIGUES, C. CASANOVA & J. C. DIAS. [Analysis on the food source of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and its present importance as a vector for *Trypanosoma cruzi*, in the State of Minas Gerais]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.43, n.2, Mar-Apr, p.125-8. 2010.

WALKER, J. A., D. A. HUGHES, B. A. ANDERS, J. SHEWALE, S. K. SINHA & M. A. BATZER. Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. **Anal Biochem**, v.316, n.2, May 15, p.259-69. 2003.

WALKER, J. A., D. A. HUGHES, D. J. HEDGES, B. A. ANDERS, M. E. LABORDE, J. SHEWALE, S. K. SINHA & M. A. BATZER. Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. **Genomics**, v.83, n.3, Mar, p.518-27. 2004.

WHO. Chagas disease, Brazil. **Wkly Epidemiol Rec**, v.75, p.153-155. 2000.