

**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
ROSÂNGELA VIEIRA SIQUEIRA**

**DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E FONTE ALIMENTAR DE TRIATOMÍNEOS E O
PAPEL DO CÃO COMO POSSÍVEL FONTE DE INFECÇÃO DO *Trypanosoma cruzi***

ALFENAS – MG

2016

ROSÂNGELA VIEIRA SIQUEIRA

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E FONTE ALIMENTAR DE TRIATOMÍNEOS E O PAPEL DO CÃO COMO POSSÍVEL FONTE DE INFECÇÃO DO *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada à Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, para a obtenção do Título de Doutora em Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal.
Orientadora: Profa. Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

ALFENAS – MG

2016

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Biblioteca Central da UNIFENAS

Siqueira, Rosângela Vieira

Distribuição geográfica e fonte alimentar de triatomíneos e o papel do cão como possível fonte de infecção do *Trypanosoma cruzi*. — Rosângela Vieira Siqueira.—Alfenas, 2016.

113 f.

Orientadora: Profª Ester Siqueira Caixeta Nogueira
Tese (Doutorado)- Programa de Pós-graduação
em Reprodução, Sanidade e Bem Estar Animal
Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2016.

1. Doenças de chagas 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Hemípteros
4. Cão I. Universidade José do Rosário Vellano II. Título

CDU : 576.8:636.7(043)



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "Distribuição geográfica e fonte alimentar de triatomíneos e o papel do cão como possível fonte de infecção do *Trypanosoma cruzi*".

Autor: Rosângela Vieira Siqueira

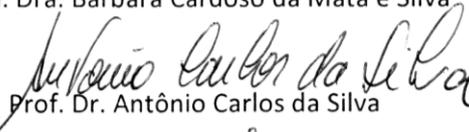
Orientador: Profa. Dra. Ester Siqueira Caixeta

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTORA EM REPRODUÇÃO, SANIDADE E BEM-ESTAR ANIMAL** pela Comissão Examinadora.


Profa. Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira
Orientadora

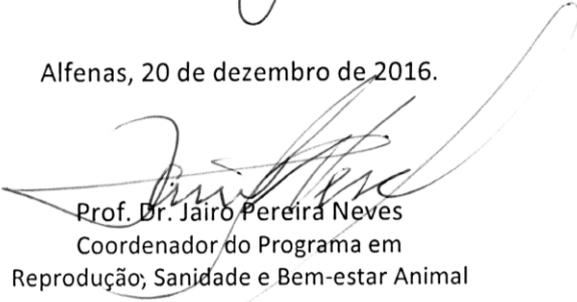

Profa. Dra. Alessandra Silva Dias


Profa. Dra. Barbara Cardoso da Mata e Silva


Prof. Dr. Antônio Carlos da Silva


Profa. Dra. Raquel Lopes Martins Souza

Alfenas, 20 de dezembro de 2016.


Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Coordenador do Programa em
Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal

“Obrigada pelo dia de hoje, pela
esperança do amanhã, pelas leis
cármicas que nos permitem o resgate,
nos permitem ver e ouvir. Pela
inteligência e a capacidade de aprender
bons sentimentos”

Zulma Maria Carvalho Vieira

AGRADECIMENTOS

Lia Maria Carvalho Vieira Machado

In memoriam

Antes de tia, minha amada, exemplo de vida e de coragem em todas as encarnações.

Jamais te esquecerei. E o meu maior sonho – te reencontrar!

Ester Caixeta Siqueira

Fábio Antônio Colombo

Fernanda Regina Teixeira Mendes

Frederico José Moreira Baêta

Marcos José Marques

Obrigada. Muito obrigada. Outro obrigada!

Antônio Siqueira

Henrique Siqueira

Lia Maria Carvalho Vieira Machado

Nelson Lourenço Machado

Terezinha Vieira Siqueira

Zulma Maria Carvalho Vieira

Minha família, meus mestres!

Ao Pai, ao Filho e ao Espírito Santo

Minha gratidão!

RESUMO

As tripanosomoses são doenças causadas por parasitos digenéticos do gênero *Trypanosoma*, cujo ciclo vital envolve dois hospedeiros – um animal vertebrado considerado hospedeiro definitivo e, diferentes invertebrados hematófagos representando os hospedeiros invertebrados ou vetores. Dentre as tripanosomoses, destaca-se a doença de Chagas, zoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, considerada de grande importância médico-veterinária por afetar o bem-estar do homem e dos animais, sendo, o cão vítima da doença e única espécie animal capaz de desenvolver alterações patológicas crônicas. O objetivo do estudo foi identificar as espécies de triatomíneos prevalentes na região, verificar a presença do *T. cruzi* e de material genético canino no conteúdo intestinal dos insetos, verificar o envolvimento do cão na manutenção do ciclo biológico destes vetores e de sua distribuição espacial na região em estudo. Os hemípteros hematófagos foram identificados quanto ao gênero e à espécie e submetidos ao exame parasitológico do conteúdo intestinal. As espécies de tripanosomatídeos foram caracterizadas pela identificação do DNA nuclear do parasito. Para a identificação da fonte alimentar dos triatomíneos, foi pesquisada a GAPDH (Proteína Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase) de cão e a β globulina humana. Foi realizado também, o exame molecular de DNA de *T. cruzi* em cães dos locais com triatomíneos positivos para este protozoário. Apenas *Panstrongylus megistus* foi identificado como vetor. Das 474 amostras de fezes de triatomíneos examinadas, em 48 (10,12%) foram encontrados, na microscopia, protozoários flagelados morfologicamente semelhantes ao *T. cruzi* e em 77 (16,24%) foi encontrado material genético compatível com *T. cruzi*. Dessas 77 amostras, foi possível identificar a fonte alimentar dos triatomíneos, sendo 13 (12%) com a presença de DNA de sangue canino. Não foi detectado material genético do *T. cruzi* nos cães examinados. A distribuição espacial dos triatomíneos, juntamente com a identificação de sangue canino, confirma que os cães podem estar envolvidos no ciclo biológico desses insetos. Esses dados contribuem para o estabelecimento de ações rápidas de vigilância epidemiológica que impeçam ou que minimizem o risco de animais de companhia, domésticos, silvestres e também de o homem se infectarem pelo agente etiológico da doença de Chagas.

Palavras chaves: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Hemípteros. Cão

ABSTRACT

Trypanosomes are diseases caused by digenetic parasites of the *Trypanosoma* gender, whose life cycle involves two hosts - a vertebrate animal considered a definitive host, and different hematophagous invertebrates representing the invertebrate hosts or vectors. Among the trypanosomes, Chagas' disease, a zoonosis caused by *Trypanosoma cruzi*, is considered of great veterinary medical importance because it affects the welfare of man and animals, being, the dog also victim of the disease and unique animal species capable of developing chronic pathological changes similar to human. The aim of the study was to identify the triatomine species prevalent in the region, to verify the presence of *T. cruzi* and canine genetic material in the intestinal contents of the insects, to verify the involvement of the dog in the maintenance of the biological cycle of these vectors and their spatial distribution in the region in study. The hematophagous hemiptera were identified as to genus and species and submitted to parasitological examination of the intestinal contents. The species of trypanosomatids were characterized by the identification of the nuclear DNA of the parasite. For the identification of the food source of the triatomines GAPDH (Glyceraldehyde Protein-3-Phosphate Dehydrogenase) dog were investigated. In this way, the triatomines of the species *Panstrongylus megistus* were identified as vectors. Only *Panstrongylus megistus* was identified as vector. Of the 474 triatomic feces samples examined, 48 (10.12%) were found in microscopy, flagellate protozoa morphologically similar to *T. cruzi*, and 77 (16.24%) genetic material was found compatible with *T. cruzi*. Of these 77 samples, it was possible to identify the food source of the triatomines, 13 (12%) with the presence of canine blood DNA. No *T. cruzi* genetic material was detected in the dogs examined. The spatial distribution of triatomines, together with the identification of canine blood, confirms that dogs may be involved in the biological cycle of these insects. These data contribute to the establishment of rapid epidemiological surveillance actions that prevent or minimize the risk of pets, domestic animals, wild animals and also humans becoming infected by the etiologic agent of Chagas' disease

Key words: Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*. Hemiptera. Dog

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO 1

Figura 1. Municípios sob jurisdição da SRS/Alfenas, com destaque na cor cinza para o município de Alfenas (sede da SRS/Alfenas), no período de julho de 2014 a julho de 2016..	53
Figura 2. Classificação dos hemípteros, recebidos dos municípios que compõem a SRS/Alfenas, quanto ao hábito alimentar, no período de julho de 2014 a julho de 2016.....	54
Figura 3. Número e porcentagem de ninfas e adultos de triatomíneos capturados nos municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, no período de julho de 2014 a julho de 2016.....	55
Figura 4. Exame parasitológico e qPCR dos conteúdos intestinais de triatomíneos capturados nos municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, no período de julho de 2014 a julho de 2016.	57
Figura 5. Amostras positivas para GAPDH (cão) de triatomíneos capturados nos municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, no período de julho de 2014 a julho de 2016.....	58
Figura 6. Triatomíneos positivos para GAPDH (cão), β -globulina humana, GAPDH (cão) + β -globulina humana e outras fontes alimentares, capturados nos municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, no período de julho de 2014 a julho de 2016.	59
Figura 7. Municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, marcados com bolas azuis, que apresentaram triatomíneos infectados pelo <i>T. cruzi</i> , no período de julho de 2014 a julho de 2016.....	60

CAPITULO 2

Figura 1. Municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.....	77
Figura 2. Classificação dos hemípteros recebidos dos municípios que compõem a SRS/Alfenas, quanto ao hábito alimentar, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014..	78
Figura 3. Distribuição quanto ao gênero e espécie de triatomíneos capturados nos municípios que compõem a SRS/Alfenas, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.....	79
Figura 4. Triatomíneos positivos (com protozoários flagelados com morfologia semelhante ao <i>T. cruzi</i>), negativos e secos, capturados nos municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.....	81

Figura 5. Triatomíneos recebidos por ano de estudo, dos municípios que compõem a SRS/Alfenas , no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.	82
Figura 6. Distribuição geográfica de triatomíneos e de triatompíneos com com flagelados morfológicamente semelhantes ao <i>T. cruzi</i> , em municípios que compõem a SRS/Alfenas, no período de julho de 2000 a julho de 2014.....	83

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1. Estádios evolutivos dos triatomíneos (*P. megistus*) e presença de protozoários flagelados morfológicamente semelhantes ao *T. cruzi*, capturados em municípios que compõem a SRS/Alfenas, no período de julho de 2014 a julho de 2016.....56

CAPITULO 2

Tabela 1. Estádios evolutivos e presença de protozoários flagelados morfológicamente semelhantes ao *T. cruzi*, em triatomíneos capturados em municípios que compõem a SRS/Alfenas. 80

LISTA DE ABREVIATURAS

Banco de Dados Geomorfológicos do Brasil - Topodata

Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA

Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase – GAPDH

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE

Modelo Digital de Elevação – MDE

Organização Mundial de Saúde - OMS

Organização Panamericana de Saúde - OPAS

Programa de Controle da Doença de Chagas - PCDCh

Reação de Cadeia em Polimerase em Tempo Real - qPCR

Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI

Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Serviço Geológico dos Estados Unidos – USGS

Shuttle Radar Topography Mission - SRTM

Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN

Superintendência Regional de Saúde de Alfenas – SRS/Alfenas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 <i>Trypanosoma rangeli</i>	21
2.2 Aspectos biogeográficos e distribuição geográfica de triatomíneos no Brasil.....	22
2.3 Doença de Chagas como zoonose	23
2.3.1 <i>Doença de Chagas no cão</i>	24
2.3.2 <i>Infecção de animais de produção por tripanosomatídeos</i>	25
3 OBJETIVO GERAL.....	28
3.1 Objetivos específicos	28
4 CAPÍTULO 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E FONTE ALIMENTAR DE TRIATOMÍNEOS E O PAPEL DO CÃO COMO POSSÍVEL FONTE DE INFECÇÃO DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
Introdução.....	32
Metodologia.....	34
Resultados e discussão	39
Conclusão	47
Referências	48
5 CAPÍTULO 2 - DISPERSÃO GEOGRÁFICA DE TRIATOMÍNEOS EM MUNICÍPIOS QUE COMPÕEM A SUPERINTENDÊNCIA REGIONAL DE SAÚDE DE ALFENAS, NO PERÍODO DE 2000 A 2014.....	61
Introdução.....	64
Objetivo	65
Metodologia.....	66
Resultados e Discussão.....	68
Conclusão	73
Referências	74

REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO A - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E FONTE ALIMENTAR DE TRIATOMÍNEOS E O PAPEL DO CÃO COMO POSSÍVEL FONTE DE INFECÇÃO DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	97
ANEXO B – NORMAS DA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL.....	98
ANEXO C – NORMAS DA REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO.....	108

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Tripanosomoses são doenças causadas por protozoários flagelados do gênero *Trypanosoma*, parasitas digenéticos que envolvem dois hospedeiros no ciclo vital – um vertebrado considerado hospedeiro definitivo e outro constituído por diferentes invertebrados hematófagos representando os hospedeiros intermediários ou vetores. Possuem distribuição cosmopolita e importância médico-veterinária e econômica na Ásia, África e América Latina, afetando o bem-estar humano e animal, a produção pecuária e o desenvolvimento agropecuário (SILVA *et al.*, 2007).

Dentre as tripanosomoses que atingem o homem e os animais de companhia destaca-se a doença de Chagas, zoonose decorrente da infecção pelo protozoário denominado *Trypanosoma cruzi*, incluído na família *Trypanosomatidae*, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, subfiló Mastigophora e filo Sarcomastigophora (NEVES *et al.*, 2011).

Recebe esse nome em homenagem ao pesquisador brasileiro Carlos Chagas que, em 1909, relatou tanto o agente etiológico, seus transmissores, reservatórios, aspectos epidemiológicos, etiopatogênicos e o conjunto de características clínicas que caracterizam a doença. É também conhecida como tripanosomose americana pelo fato de a América do Sul, a América Central e algumas áreas da América do Norte serem consideradas áreas endêmicas da doença embora, atualmente, esteja sendo detectada em outros continentes (MOTA *et al.*, 2014).

Vale mencionar que a doença de Chagas é considerada uma das moléstias de mais ampla distribuição no continente americano, estendendo-se desde o Texas nos Estados Unidos até a extremidade dos países do cone sul (SILVEIRA, 2009), com a estimativa de prevalência de 16 a 18 milhões de infectados (DIAS, 2011) e de aproximadamente 100 milhões de indivíduos sob o risco de infecção (ZETUN *et al.*, 2014).

No Brasil, até a década de 1930 era considerada predominantemente rural. A partir dessa época, em decorrência do êxodo rural, houve a migração de indivíduos chagásicos para as cidades em busca de melhores condições de trabalho e de vida. Dessa forma, ocorreu a urbanização da doença, principalmente, na periferia dos grandes centros.

Estima-se a existência de dois a três milhões de infectados no Brasil, sendo Minas Gerais considerado um dos estados com maior prevalência da doença. Atualmente, a região amazônica tem sido reconhecida como uma antroopozoonose emergente (SILVA *et al.*, 2010).

Estudos mostram que o *T. cruzi* apresenta populações com comportamentos heterogêneos nos ciclos domésticos e silvestres. Já na década de sessenta, era utilizada a expressão “complexo cruzi”, embasada nas variações morfológicas, imunológicas e de virulência, para melhor compreender os diferentes padrões comportamentais regionais da doença. Esse fato está hoje esclarecido por se conhecer que o *T. cruzi* é uma espécie heterogênea composta de várias subpopulações que circulam entre diferentes hospedeiros vertebrados, domésticos e silvestres e em hospedeiros invertebrados (SANTANA *et al.*, 2012).

Por outro lado, como enfermidade enzoótica a tripanosomose americana tem uma difusão mais ampla do que a infecção humana. Tem sido detectada em diferentes espécies de animais de companhia, domésticos e selvagens incluindo cães, gatos, roedores e marsupiais (SCHIMUÑIS, 2000). Dentre os animais de companhia, cães e gatos têm importância epidemiológica no processo de infecção por vetores, no entanto, nas moradias, o homem e o cão são aproximadamente três vezes mais infectados do que os gatos, sendo o cão, a única espécie animal capaz de desenvolver as alterações patológicas crônicas da doença semelhantes à do homem, deixando clara sua importância como principal reservatório doméstico do parasito (SANTANA *et al.*, 2012).

No ambiente silvestre, mamíferos terrestres e arborícolas têm sido encontrados naturalmente infectados pelo *T. cruzi* em áreas endêmicas para a doença de Chagas. Esse fato vem justificando uma recomendação de atenção especial aos animais silvestres capazes de se aproximarem das moradias humanas como gambás e roedores, fato que muitas vezes é facilitado pelo próprio homem que tanto lhes retira o alimento e o abrigo quando altera o meio ambiente ou facilita o encontro de comida com o armazenamento de grãos em construções rústicas. Esses animais tanto podem levar o parasito para o domicílio e peridomicílio humano, como também, auxiliar na dispersão dos triatomíneos que podem ser carreados em suas pelagens para outros locais (ZETUN *et al.*, 2014).

Outras espécies do gênero *Trypanosoma*, como o *T. theileri*, *T. equiperdum*, *T. evansi* e *T. vivax*, podem infectar bovinos, sendo as duas últimas consideradas de importância veterinária. No entanto, torna-se importante salientar que *T. theileri*, *T. equiperdum*, *T. evansi* e *T. vivax* não são transmitidos aos seus hospedeiros por triatomíneos, mas por moscas da família tabanidae (ABRÃO *et al.*, 2009)

O *T. cruzi* pode ser transmitido ao homem por diferentes formas, destacando-se a transmissão por triatomíneos infectados (ALMEIDA *et al.*, 2009). E, ainda hoje, a doença de Chagas é considerada como um problema de saúde pública grave em diversos países da

América Latina, pela possibilidade da domicialização dos triatomíneos, deslocados de seus ecótopos silvestres pela alteração do meio ambiente (BARBOSA *et al.*, 2012).

Nesse contexto, é mister salientar que o município de Alfenas está localizado em uma região geográfica que sofreu um grande impacto ambiental com as obras da barragem da hidrelétrica de Furnas que tiveram início em fevereiro de 1957 e foram concluídas em janeiro de 1963, com o represamento das águas do Rio Grande e de seus afluentes.

Além disso, a região é caracterizada pela vocação agropecuária, que exigiu o desmatamento de extensas áreas para o plantio das lavouras de café, de cana-de-açúcar e de laranja. Isso propicia uma intensa corrente migratória nas épocas das safras agrícolas e, por constituir em importante referência para o ensino superior, também é fator de atração de pessoas de diferentes regiões geográficas do país, inclusive de áreas endêmicas para importantes doenças parasitárias como a doença de Chagas e a esquistossomose.

Dessa forma, há que se considerar que as características fisiográficas do município, aliadas às modificações ambientais em curso podem contribuir para alterar a dinâmica populacional dos artrópodes - dentre eles os triatomíneos, podendo em decorrência, colocar em risco a população humana local ou migrante no sentido de contrair doenças veiculadas por esses insetos.

Torna-se então importante enfatizar os relatos de Almeida (2009), ao evidenciar que o controle vetorial é o ponto chave para minimizar a transmissão da doença, já que vacinas ou tratamento eficaz para a fase crônica da infecção, apesar de incansáveis esforços, ainda estão por ser desenvolvidos. O íntimo contato dos insetos vetores infectados pelo *T. cruzi*, com os seres humanos e com animais é propiciado, principalmente, pela precariedade das moradias nas áreas rurais e até mesmo urbanas, o que cria condições favoráveis à infestação das casas pelos triatomíneos.

Assim, a abordagem multidisciplinar sobre os vetores da doença de Chagas vem ocupando um papel de destaque para um melhor direcionamento das medidas de controle bem como, para uma precisa avaliação dos riscos de transmissão do *T. cruzi* ao homem, aos animais de companhia, domésticos e silvestres em uma determinada região geográfica. Nesse contexto, faz-se necessário o estudo dos possíveis vetores do protozoário em uma determinada região, na qual se pretende estabelecer medidas de controle e de vigilância da doença de Chagas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A doença de Chagas ou tripanosomose americana é causada pelo protozoário denominado *T. cruzi*, transmitido ao homem e aos animais, principalmente, por hemípteros hematófagos dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, denominados triatomíneos e conhecidos popularmente por "barbeiros", "chupões", "chupanças", "procotós", "bícimo", "fincões" ou "vum-vum" (NEVES *et al.*, 2011).

Após a infecção pelo *T. cruzi*, tem início a fase aguda da doença. Nessa fase os infectados podem ser assintomáticos ou apresentar sinais e sintomas da doença como febre, mal-estar, astenia, anorexia, cefaleia, linfadenopatia, hepato e esplenomegalia, alterações cardíacas e neurológicas, podendo apresentar, também, o sinal de Romana e o chagoma de inoculação. Na fase crônica, alguns indivíduos podem apresentar uma fase assintomática da doença que é chamada indeterminada. Entretanto, outros infectados podem desenvolver a forma cardíaca da doença, denominada miocardiopatia chagásica ou, a forma digestiva que envolve o comprometimento do esôfago e do cólon, caracterizando respectivamente os quadros clínicos de megaesôfago e de megacolon (NEVES *et al.*, 2011).

Considerando-se os graves comprometimentos que a doença pode provocar no organismo humano, torna-se importante enfatizar o impacto causado no estado de saúde e na qualidade de vida do indivíduo infectado, tornando a doença uma relevante causa de morbimortalidade na população humana (MOTA *et al.*, 2014).

Revisando os aspectos epidemiológicos nota-se que desde a sua descoberta a doença de Chagas é considerada uma endemia predominantemente rural. Entretanto, nos últimos anos, devido às migrações humanas para áreas urbanas, a doença também passou a ser considerada uma endemia urbana e um problema mundial, com notificação em países onde antes não ocorria como Espanha, Estados Unidos, Canadá e Austrália (World Health Organization, 2007; PIRON *et al.*, 2008).

Confirmando essa problemática, Coura; Viñas (2010), relataram que a disseminação do *T. cruzi* para diversas regiões do mundo devido à migração populacional constitui um alerta para a possibilidade do agravo se tornar questão de saúde pública em regiões do mundo consideradas indenes e, de acordo com Mota *et al.*, (2014), não preparadas para a prevenção e para o controle da transmissão transfusional e vertical do parasito, consideradas as principais vias de infecção em países onde não há o ciclo natural da doença.

A transmissão do *T. cruzi* ao homem pode ocorrer por diferentes mecanismos: pelo vetor (CHAGAS, 1909); por transplante de órgãos (SHIKANAI-YASSUDA *et al.*, 1990); por ingestão de triatomíneos infectados e por canibalismo entre diferentes espécies animais e em acidentes em laboratórios (REICHE; JANCKEVICIUS, 1997); de forma congênita (MORETTI *et al.*, 2005); por transfusão de sangue (ALMEIDA *et al.*, 2009); por via oral (CAVALCANTI *et al.* 2009) por meio da ingestão do suco da cana de açúcar ou da pasta de açaí contaminados pelo *T. cruzi*. A transmissão vetorial ainda considerada a mais importante, podendo ocorrer ciclos domésticos, peridoméstico e silvestre (ALMEIDA *et al.*, 2009).

O ciclo de transmissão vetorial doméstico é considerado o de maior importância epidemiológica, podendo haver a transmissão do parasito ao homem, além de cães, gatos e cobaias em alguns países. No ciclo silvestre, os vetores podem contaminar roedores, marsupiais como gambás e outros animais silvestres. O ciclo peridoméstico é considerado um possível elo entre os ciclos doméstico e silvestre pois envolve mamíferos como roedores domésticos, marsupiais, cães e gatos que tem livre acesso às residências e, ainda, vetores silvestres que podem invadir as residências atraídos pela luz e por alimento (ZETUN *et al.*, 2014).

Os vetores do *T. cruzi* são insetos hematófagos incluídos na subfamília Triatominae, família Reduviidae, subordem Heteroptera, ordem Hemiptera, classe Insecta e filo Arthropoda. A transmissão vetorial do *T. cruzi* ao homem e aos animais ocorre pelo contato com as fezes contaminadas dos triatomíneos que, ao picarem os vertebrados, em geral defecam após o repasto sanguíneo, eliminando formas tripomastigotas metacíclicas, que penetram pelo orifício da picada ou por solução de continuidade deixada pelo ato de coçar (NEVES *et al.*, 2011).

Silveira; Feitosa; Borges (1984) consideram que dentre as mais de 120 espécies de triatomíneos existentes em diferentes países do mundo cerca de 42 espécies já foram identificadas no Brasil. Dentre estas, 30 possíveis de serem detectadas em ambiente doméstico, das quais 4 consideradas potenciais transmissoras do *T. cruzi* ao homem: *Triatoma infestans*; *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*.

Entretanto, em 2006, foi certificada pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a eliminação da transmissão vetorial pelo *T. infestans* em todos os estados do Brasil, fato que contribuiu para a redução no número de crianças infectadas, pelo controle da contaminação pelo *T. cruzi* nos bancos de sangue bem como, pela diminuição da prevalência da doença entre os doadores de sangue (DIAS, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Mas, devido às alterações ambientais, outras espécies de triatomíneos de importância secundária passaram a ser capturadas nos peridomicílios e nos domicílios humanos (PAULA *et al.*, 2010). Atualmente, espécies como o *T. rubrovaria*, no Rio Grande do Sul, e *Rhodnius neglectus* em Goiás, têm sido encontradas no domicílio. O *T. vitticeps* no Rio de Janeiro e no Espírito Santo e o *P. lutzi* no Ceará e em Pernambuco merecem atenção pelas altas taxas de infecção natural. *R. nasutus* tem sido frequentemente capturado no peridomicílio do nordeste brasileiro, nos estados do Ceará e do Rio Grande do Norte. Na amazônia, as espécies mais frequentes são *R. pictipes*, *R. robustus*, *P. geniculatus*, *P. lignarius* e *T. maculata*. As espécies do gênero *Rhodnius* encontram-se associadas a palmeiras enquanto as espécies dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* vivem, preferencialmente, em associação com hospedeiros terrestres, e ao longo de seu processo evolutivo, adaptaram-se aos domicílios humanos e às construções no peridomicílio, como galinheiros, chiqueiros e tocas de outros animais, tornando-se importantes na transmissão da doença ao homem (ARGOLO *et al.*, 2008; BRASIL, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2012).

Outro fato que merece ser destacado é que as fêmeas de triatomíneos depositam seus ovos livremente no ambiente e que os ovos de algumas espécies possuem substâncias adesivas fazendo com que fiquem aderidos ao substrato que os apoiam. Essa é uma característica importante, uma vez que ovos aderidos a penas de aves, folhas de plantas, materiais utilizados em construções podem ser transportados a longas distâncias, favorecendo o processo de dispersão e de colonização dos triatomíneos em novos ambientes como domicílios e peridomicílios humanos (NEVES *et al.*, 2011).

Considerando a possibilidade de deslocamento dos triatomíneos para outras regiões geográficas, por meio de objetos e, que a formação de novas colônias está condicionada a fatores como a vegetação, o clima e, a umidade e, é importante relatar que todos os municípios que compõem a SRS/Alfenas sofreram grande impacto ambiental com o represamento de rios e a formação do Lago de Furnas. São municípios localizados na mesoregião sul/sudoeste de Minas Gerais, fazendo parte da bacia do Rio Grande, ocupando uma área total de 9.790,433 Km² (IBGE, 2015). Esta área é caracterizada como uma zona de transição entre cerrado e Mata Atlântica, o que proporciona uma grande diversidade de paisagens, de relevo e de vegetação, onde conseqüentemente a pressão sobre a fauna e a flora foram influenciados por inúmeros fatores, como a atividade agropecuária, exploração de insumos vegetais e minerais e a expansão urbana. Fato que provocou, ao longo do tempo, alterações consideráveis na cobertura vegetal original, em toda a dinâmica do ecossistema, ocupação do solo e, conseqüentemente, na alteração do ciclo silvestre dos triatomíneos e a

aproximação desses insetos dos domicílios e peridomcílhos humanos em busca de alimento e abrigo.

Esses municípios estão localizados na mesorregião sul/sudoeste de Minas Gerais, fazendo parte da bacia do Rio Grande, cuja população estimada é de 463.395 habitantes, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), (IBGE, 2015). De acordo com o projeto Banco de Dados Geomorfológicos do Brasil (Topodata) (2009), que oferece o Modelo Digital de Elevação (MDE) e suas derivações locais básicas em cobertura nacional, podem-se extrair as cotas mínimas e máximas aproximadas de altitudes dos municípios que compõem a região de abrangência da SRS/Alfenas. Essa região se insere num conjunto geomorfológico dinâmico influenciado estruturalmente pela depressão da Bacia do Paraná, pelo conjunto da Serra da Canastra e pelo encaixe do Lago de Furnas.

O clima predominante na região que abrange os municípios da SRS/Alfenas, com base na classificação de Köppen-Geiger feita em 1928, é o Clima Temperado Chuvoso Quente, com variação média de temperatura nos meses mais frios do ano entre -3° C e 18° C e estações de inverno e verão bem definidas (SÁ JÚNIOR, 2009).

A vegetação na é caracterizada como uma zona de transição entre cerrado e mata Atlântica, o que proporciona uma grande diversidade de paisagens, de relevo e de vegetação, onde conseqüentemente a pressão sobre a fauna e a flora foi influenciada por inúmeros fatores, como a atividade agropecuária, a exploração de insumos vegetais e minerais e expansão urbana. Esse fato provocou, ao longo do tempo, alterações consideráveis na cobertura vegetal original, em toda a dinâmica do ecossistema, na ocupação do solo e, conseqüentemente, na alteração do ciclo silvestre dos triatomíneos e na aproximação desses insetos dos domicílios e peridomílios humanos em busca de alimento e abrigo.

2.1 *Trypanosoma rangeli*

É um tripanosomatídeo que apresenta ampla distribuição geográfica nas Américas Central e do Sul, sendo encontrado também no Brasil. Infecta hemípteros hematófagos, o homem e diferentes espécies de mamíferos. Não é considerado patogênico para os hospedeiros vertebrados, sendo capaz de causar baixa parasitemia e de curta duração, existindo controvérsias quanto a sua reprodução no organismo hospedeiro NEVES *et al.*, (2011).

O fato de ocorrer, em uma mesma região geográfica, a presença simultânea de *T. cruzi* e de *T. rangeli* possibilita a existência de infecções únicas ou mistas. Além disso, o fato de ser um protozoário morfológicamente semelhante ao *T. cruzi* que não pode ser distinguido pelo exame parasitológico direto dificulta o diagnóstico morfológico diferencial das espécies. Nesse sentido, é recomendada para facilitar o diagnóstico diferencial, a utilização de metodologias como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (VALLEJO et al., 2015).

2.2 Aspectos biogeográficos e distribuição geográfica dos triatomíneos no Brasil

Os triatomíneos podem ser encontrados em todo o território brasileiro, em ambientes silvestres naturais ou alterados e, considerados potencialmente capazes de colonizar facilmente peridomicílios e domicílios humanos e de se alimentarem do sangue de animais domésticos, de companhia e do homem (FIGUEIREDO; SILVA; BOLOGNEZ, 2007).

Fatores relacionados a relevo, clima, vegetação e solo podem influenciar a incidência desses insetos em determinadas regiões. Torna-se necessário mencionar que, Forattini *et al* (1974) já relatavam que a sinantropia dos triatomíneos associada à ação antrópica, responsável por intensas alterações ambientais principalmente relacionadas à destruição e/ou à alteração da cobertura vegetal primitiva influencia a domiciliação dos triatomíneos e facilita a transmissão do *T. cruzi* aos animais e ao homem. Também, Mendes; Lima (2011) relatam que, mesmo em regiões cuja vegetação nativa foi reduzida pela agricultura e pela pecuária, ainda ocorrem populações de triatomíneos silvestres capazes de colonizar peri e intradomicílios, sendo que o *T. cruzi*, ainda que com baixa incidência, persiste nesses locais como enzootia silvestre.

Na região amazônica, caracterizada pela floresta úmida tropical, umbrosa, com alta pluviosidade e crescente ação antrópica há grande dispersão da fauna triatomínica associada à degradação do ambiente natural e ao deslocamento dos triatomíneos do ambiente silvestre (AGUILAR *et al.*, 2007; MASSARO; REZENDE; CAMARGO. 2008). Nessa região, a invasão das moradias humanas e de locais de armazenamento e de processamento de alimentos por triatomíneos adultos é considerada a principal forma de transmissão do *T. cruzi* ao homem e aos animais. Esse fato, que caracteriza surtos da doença de Chagas por transmissão oral em grupos familiares e comunitários (BELTRÃO *et al.*, 2009; MILES, 2010).

Ao longo dos anos, estudos como os de Clark (1935) e de Alarcón (1980) mostraram a sensibilidade dos triatomíneos frente a pequenas alterações da temperatura ambiente e da umidade, fato também relatado por Zeledón; Rabinovich (1981) como a causa mais importante que influencia na distribuição geográfica desses vetores. Wigglesworth; Gillet (1934) observaram que triatomíneos são capazes de perceber as alterações térmicas e que essa percepção é um dos principais fatores que determinam o encontro de hospedeiros como potenciais fontes alimentares. Esse fato foi comprovado por Friend ; Smith (1985) que mostraram que o comportamento alimentar dos triatomíneos pode ser estimulado por objetos aquecidos.

É importante relatar que em casos de densidades elevadas de triatomíneos adultos em uma estrutura populacional, há a dispersão destes para habitats artificiais como galinheiros, tocas de animais e outros, ocorrendo a colonização desses locais. Esse fato é observado principalmente no período de outubro a dezembro para *P. megistus* (CARCAVALHO *et al.*, 1997).

Dessa forma, fica clara a necessidade do conhecimento dos fatores que interferem na ocorrência e na distribuição de triatomíneos no território brasileiro, como os descritos acima, para o estabelecimento de medidas de controle e de vigilância epidemiológica que possam evitar a incidência desses insetos e a colonização de tocas de animais e de domicílios humanos, o que pode ser facilitado, por meio de programas que envolvam a participação da população e a participação de equipes de vigilância ambiental de municípios e dos estados federativos, ações que minimizem a transmissão vetorial do *T. cruzi* (DIAS *et al.*, 2016).

2.3 Doença de Chagas como zoonose

O *T. cruzi* pode infectar tanto o homem como animais de companhia, domésticos e silvestres, fato que requer atenção dentre as medidas profiláticas para se evitar o risco de adoecer. Existe o relato na literatura de cerca de 200 espécies de mamíferos já encontrados infectados pelo *T. cruzi* incluindo marsupiais como marsupiais (*Didelphis* sp, *Philander* sp, *Marmosa* sp) roedores (*Nectomys* sp, *Neotoma* sp, *Akodan* sp, *Rattus* sp, *Proechymis* sp) carnívoros (*Procyon* sp, *Tayra* sp, *Urocyon* sp) e primatas (*Saimiri* sp, *Aotus* sp, *Leontocebus* sp, *Cebus* sp). Porém, dentre as espécies de animais anteriormente citadas, não são todas consideradas reservatórios para o *T. cruzi*, sendo considerada de maior importância epidemiológica a infecção de mamíferos que podem circular entre os ambientes domésticos

ou peridomésticos como o cão e o gato ou se aproximar das moradias humanas como o rato e o gambá. Espécies animais de sangue frio e aves são refratários à infecção pelo *T. cruzi*, mas considerados relevantes na epidemiologia da doença de Chagas por servirem como fonte alimentar para triatomíneos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; CIDEIM, 1994; NÓBREGA *et al.*, 2009).

2.3.1 Doença de Chagas no cão

Dentre os animais de companhia, possíveis de infecção pelo *T. cruzi*, que circulam livremente nas moradias humanas, os cães são descritos como o reservatório mais importante e sentinela da infecção por *T. cruzi*, por terem sido expostos ao ciclo de transmissão, comprovando a ocorrência da infecção no local, sendo que o cão é a única espécie capaz de desenvolver alterações crônicas semelhantes às observadas no homem, além de apresentar as formas aguda, indeterminada e crônica da doença (SOUZA *et al.*, 2008).

A infecção pode ocorrer quando triatomíneos infectados picam o animal e defecam contaminando o local da picada ou por via oral, quando o cão ingere triatomíneos ou tecidos de reservatórios silvestres infectados com o *T. cruzi* (SANTANA, *et al.*, 2012) e, ainda, por via transplacentária e pela amamentação (PAVARINI, 2009).

As manifestações agudas da doença são caracterizadas por infecção generalizada, com lesões no miocárdio e no sistema nervoso central, podendo ser observada também anorexia, linfadenopatia generalizada, diarreia, miocardite e até mesmo a morte súbita decorrente de arritmia grave. A fase crônica inicia de oito a trinta e seis meses após a infecção inicial e o animal pode manter-se assintomático ou apresentar distúrbios no ritmo cardíaco (SANTANA, *et al.*, 2012).

Torna-se importante enfatizar que os cães podem atuar como reservatórios intradomiciliares ou peridomiciliares do *T. cruzi*, o que é considerado como um fator de risco significativo para outros animais e para a população humana (ALMEIDA *et al.*, (2013). A pesquisa da doença de Chagas nesses animais representa uma forma de se detectar o risco imediato para as pessoas que mantêm contato com os animais de serem infectadas pelo protozoário, reforçando-se assim, o papel do médico veterinário no bem-estar humano, animal e na saúde pública (PAVARINI, 2009).

Portanto, a presença de infecção natural no animal reabre a questão da importância do cão na epidemiologia da doença de Chagas e sugere um alerta aos veterinários para a

existência dessa enfermidade. Esse fato confirmado por Diniz (2016) ao relatar a identificação de triatomíneos infectados pelo *T. cruzi* no zoológico de Brasília no viveiro de micos, a possibilidade da contaminação do homem pelas fezes do “barbeiro”, pelo sangue ou saliva dos macacos e a evidência de cães contaminados na região.

2.3.2 Infecção de animais de produção por tripanosomatídeos

Na América do Sul, as tripanossomoses em animais de produção são causadas pelos protozoários *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*, sendo os três últimos considerados os de maior importância veterinária por serem mais patogênicos (ABRÃO *et al.*, 2009).

Segundo Perry *et al.* (2002), as tripanossomoses estão incluídas entre as vinte doenças mais importantes de acordo com o impacto socioeconômico na região onde ocorrem, sendo que febre aftosa, antrax, ectoparasitoses, fascioloses, entre outras doenças, estão na mesma relação. Ainda de acordo com os mesmos autores, as tripanossomoses estão entre as dez zoonoses mais importantes junto com a tuberculose bovina, bruceloses, cisticercose, leptospirose, entre outras.

No Brasil, já foram detectadas formas sanguíneas do *T. theileri* em gado naturalmente infectado nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Pará e Rio Grande do Sul. Esse protozoário tem como vetor moscas hematófagas da família Tabanidae e a tripanosomose não está relacionada a nenhum processo patogênico, apenas tem sido associada com linfocitose nos animais infectados (BOSE *et al.*, 1987; MARTINS; LEITE; DOYLE, 2008).

A tripanosomose causada pelo *T. equiperdum* é conhecida como dourine. É considerada erradicada em vários países, sendo atualmente endêmica em algumas regiões geográficas da África e da Ásia, incluindo a Rússia. Ocasionalmente surtos da doença são relatados em outras áreas, incluindo a Europa ou ocorrer em regiões onde animais não são submetidos ao diagnóstico. Acomete cavalos, jumentos e mulas, os quais parecem constituir reservatórios naturais do parasito. Zebras, cachorros e ratos podem ser infectados experimentalmente. É caracterizada por edema da genitália, placas cutâneas e sinais neurológicos. A transmissão do parasito ocorre diretamente de equino para equino – os parasitos presentes no fluido seminal e nas membranas mucosas da genitália do animal doador

são transferidos de um animal para o outro durante o coito, não existindo evidência da participação de vetores na transmissão. (BRUN; HECKER; LUN, 1998; ____, 2009).

T. evansi afeta principalmente equinos embora possa atingir também cães, cabras, capivaras, bovinos e búfalos. É caracterizada por febre intermitente, anemia normocítica e normocrômica, leucocitose com linfocitose, conjuntivite, edema de membros e das partes ventrais do corpo, perda de pelos, emagrecimento progressivo, inapetência e, ocasionalmente, hemorragias na câmara anterior do olho. Na fase crônica da doença a fraqueza é progressiva, as membranas mucosas tornam-se pálidas, alguns animais apresentam icterícia, nódulos linfáticos superficiais entumecidos e incoordenação motora com paralisia dos membros posteriores causando claudicação, o que leva a denominação popular da doença de “mal das cadeiras” no Brasil, “murrina” no Panamá e “surra” em países Asiáticos (SILVA *et al.*, 2010). Pode ser transmitido por moscas da família Tabanidae e Stomoxidae e, também por morcegos hematófagos e carrapatos (SILVA, *et al.*, 2007).

No Brasil, o *T. evansi* infecta cavalos, principalmente no Pantanal, onde a doença tem importância econômica devido ao grande número de equinos na região (RODRIGUES *et al.*, 2009).

T. vivax infecta bovinos, ovinos e caprinos, sendo prevalente nas regiões Norte e Central (Pantanal) do Brasil. Os sinais clínicos incluem perda progressiva de peso, queda de fertilidade e de produção de carne, aborto, agalaxia e, eventualmente, morte. Também deve ser considerado um causador de danos reprodutivos em bovinos e ovinos. Nos machos, as alterações acarretam perda de libido, retardamento da puberdade e má qualidade do sêmen. Nas fêmeas, podem ocorrer anestro temporário ou permanente, ciclos estrais anormais, morte fetal, distocia, abortamento, morte neonatal, além de efeitos patogênicos no feto e no recém-nascido (BATISTA *et al.*, 2008; ABRÃO *et al.*, 2009). Na Ásia e na África é transmitido por moscas tsé-tsé (*Glossina* spp.) enquanto na América do Sul e Central e no Caribe é transmitido por outras moscas hematófagas (CARVALHO *et al.*, 2008).

Na América do Sul, estudos sobre a ocorrência de *T. vivax* vinham sendo realizados principalmente em áreas endêmicas, como no Pantanal e região norte do Brasil (CADIOLI *et al.*, 2012). Entretanto, no período de setembro a outubro de 2008, foi feito primeiro relato da ocorrência de *T. vivax* em um rebanho leiteiro de Minas Gerais. Na época na qual ocorreu o surto os impactos econômicos da doença no rebanho foram calculados com base em mortes diretas, abortos, natimortos e queda no ganho de peso e na produção de leite, além dos gastos com drogas tripanomicidas (CARVALHO *et al.*, 2008). Ainda em 2008, houve a descrição de um surto envolvendo o *T. vivax* no município de Lins – SP, na ausência de tabanídeos e com

grande presença de *Haematobia irritans* (mosca dos chifres) e de *Stomoxys calcitrans* (mosca dos estábulos) Os Animais acometidos apresentaram febre, icterícia, diminuição da produção de leite, perda de peso, diarreia profusa, abortos, anemia, leucocitose e hiperfibrigenemia. Foram registrados 31 óbitos de vacas e bezerros em 1.080 bovinos no total. Três vacas apresentaram sintomatologia nervosa, como dismetria, ataxia e fraqueza muscular, além de ptialismo, aumento de linfonodos e edema submandibular. (CADIOLI *et al.*, 2012).

Nesse contexto e considerando a importância médico-veterinária das tripanosomoses, pensamos que o conhecimento do da fauna triatominae dos municípios sob a jurisdição da Superintendência Regional de Saúde de Alfenas (SRS/Alfenas) e de sua fonte alimentar, além da caracterização de outros condicionantes epidemiológicos envolvendo a determinação específica do protozoário flagelado identificado no conteúdo intestinal dos triatomíneos pelo exame parasitológico dos exemplares examinados, proporciona mais um elo de fortalecimento na luta pelo controle de vetores de diferentes doenças, entre estas a doença de Chagas, contribuindo para a promoção de saúde da população humana, para a sanidade e para o bem-estar animal em Alfenas e na região.

3 OBJETIVO GERAL

Identificar as espécies de triatomíneos prevalentes na região, verificar a presença do *T. cruzi* e de material genético canino no conteúdo intestinal dos insetos, verificar o envolvimento do cão na manutenção do ciclo biológico desses vetores e sua distribuição espacial na região em estudo.

3.1 Objetivos específicos

Classificar os hemípteros quanto ao hábito alimentar em hematófagos, fitófagos ou predadores.

Identificar morfologicamente os triatomíneos/vetores quanto ao gênero e, se possível, à espécie.

Realizar o exame parasitológico do conteúdo intestinal (fezes) dos triatomíneos para a pesquisa de protozoários flagelados com morfologia semelhante ao *T. cruzi*.

Pesquisar o DNA do *T. cruzi* no conteúdo intestinal dos triatomíneos.

Pesquisar o DNA do cão em amostras do conteúdo intestinal de triatomíneos para identificação da fonte alimentar.

Realizar o diagnóstico molecular da doença de Chagas em cães nos locais de triatomíneos positivos para *T. cruzi*.

Representar espacialmente as zonas de riscos biológicos para o estabelecimento de focos de transmissão do *T. cruzi* na área em estudo a partir dos dados da presença de triatomíneos infectados.

4 CAPITULO 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E FONTE ALIMENTAR DE TRIATOMÍNEOS E O PAPEL DO CÃO COMO POSSÍVEL FONTE DE INFECÇÃO DO *Trypanosoma cruzi*

O presente artigo encontra-se de acordo com as normas de submissão exigidas pelo periódico Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Rosângela Vieira Siqueira ⁽¹⁾, Asafe Costa Lopes ⁽¹⁾, Hugo Pieve Darcádia ⁽¹⁾, Frederico José Moreira Baêta⁽²⁾, Fernanda Regina Teixeira Mendes⁽²⁾, Marcos José Marques ⁽²⁾, Ester Caixeta Siqueira Nogueira ⁽¹⁾

(1) Universidade José do Rosário Vellano, Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Reprodução Animal, Rodovia MG 179, Km 0, CEP 37130-000 Alfenas, MG, Brasil. E-mail: rosansiqueira@yahoo.com.br, ecaixeta@gmail.com, asafecosta@gmail.com, hugopieve@gmail.com

(2) Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Biomédicas, R. Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Centro, 37130-000, Alfenas, MG, Brasil. E-mail: marques.prppg@gmail.com, fredbaeta2@gmail.com, fe.reginamendes@gmail.com

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Vigilância Epidemiológica da Superintendência Regional de Saúde de de Alfenas e da Secretaria Municipal de Saúde de Alfenas.

Instituto de Prevenção e Diagnóstico J. Janini. Varginha-MG.

Resumo

As tripanosomoses são doenças causadas por parasitos digenéticos do gênero *Trypanosoma*, cujo ciclo vital envolve dois hospedeiros – um animal vertebrado considerado hospedeiro definitivo e, diferentes invertebrados hematófagos representando os hospedeiros invertebrados ou vetores. Dentre as tripanosomoses, destaca-se a doença de Chagas, zoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, considerada de grande importância médico-veterinária por afetar o bem-estar do homem e dos animais sendo, o cão vítima da doença e única espécie animal capaz de desenvolver alterações patológicas crônicas. O objetivo do estudo foi identificar as espécies de triatomíneos prevalentes na região; verificar a presença do *T. cruzi* e de material genético canino no conteúdo intestinal dos insetos; verificar o envolvimento do cão na manutenção do ciclo biológico desses vetores e sua distribuição espacial na região em estudo. Os hemípteros hematófagos foram identificados quanto ao gênero e à espécie e submetidos ao exame parasitológico do conteúdo intestinal. As espécies de tripanosomatídeos foram caracterizadas pela identificação do DNA nuclear do parasito. Para a identificação da fonte alimentar dos triatomíneos foi pesquisado a GAPDH (Proteína Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase) de cão e a β globulina humana. Foi realizado também o exame molecular de DNA de *T. cruzi* em cães dos locais com triatomíneos positivos para este protozoário. Apenas *Panstrongylus megistus* foi identificado como vetor. Das 474 amostras de fezes de triatomíneos examinadas, em 48 (10,12%) foram encontrados, na microscopia, protozoários flagelados morfologicamente semelhantes ao *T. cruzi* e, em 77 (16,24%) foi encontrado material genético compatível com *T. cruzi*. Dessas 77 amostras, foi possível identificar a fonte alimentar dos triatomíneos, sendo 13 (12%) com a presença de DNA de sangue canino. Não foi detectado material genético do *T. cruzi* nos cães examinados. A distribuição espacial dos triatomíneos, juntamente com a identificação de sangue canino, confirma que os cães podem estar envolvidos no ciclo biológico desses insetos. Esses dados contribuem para o estabelecimento de ações rápidas de vigilância epidemiológica que impeçam ou minimizem o risco de animais de companhia, domésticos, silvestres e também do homem se infectarem pelo agente etiológico da doença de Chagas.

Palavras chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Hemípteros.

Abstract

Trypanosomes are diseases caused by digenetic parasites of the *Trypanosoma* gender, whose life cycle involves two hosts - a vertebrate animal considered a definitive host, and different hematophagous invertebrates representing the invertebrate hosts or vectors. Among the trypanosomes, Chagas' disease, a zoonosis caused by *Trypanosoma cruzi*, is considered of great veterinary medical importance because it affects the welfare of man and animals, being, the dog also victim of the disease and unique animal species capable of developing chronic pathological changes similar to human. The aim of the study was to identify the triatomine species prevalent in the region, to verify the presence of *T. cruzi* and canine genetic material in the intestinal contents of the insects, to verify the involvement of the dog in the maintenance of the biological cycle of these vectors and their spatial distribution in the region in study. The hematophagous hemiptera were identified as to genus and species and submitted to parasitological examination of the intestinal contents. The species of trypanosomatids were characterized by the identification of the nuclear DNA of the parasite. For the identification of the food source of the triatomines GAPDH (Glyceraldehyde Protein-3-Phosphate Dehydrogenase) dog were investigated. In this way, the triatomines of the species *Panstrongylus megistus* were identified as vectors.. Only *Panstrongylus megistus* was identified as vector. Of the 474 triatomic feces samples examined, 48 (10.12%) were found in microscopy, flagellate protozoa morphologically similar to *T. cruzi*, and 77 (16.24%) genetic material was found compatible with *T. cruzi*. Of these 77 samples, it was possible to identify the food source of the triatomines, 13 (12%) with the presence of canine blood DNA. No *T.cruzi* genetic material was detected in the dogs examined. The spatial distribution of triatomines, together with the identification of canine blood, confirms that dogs may be involved in the biological cycle of these insects. These data contribute to the establishment of rapid epidemiological surveillance actions that prevent or minimize the risk of pets, domestic animals, wild animals and also humans becoming infected by the etiologic agent of Chagas' disease

Key words: Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*. Hemiptera. Dog

Introdução

Dentre as tripanosomoses que atingem o homem e os animais de companhia destaca-se a doença de Chagas, zoonose decorrente da infecção pelo protozoário denominado *Trypanosoma cruzi* ⁽¹⁾.

Como enfermidade enzoótica a tripanosomose americana tem uma difusão mais ampla do que a infecção humana. Tem sido detectada em diferentes espécies de animais de companhia, domésticos e selvagens, incluindo cães, gatos, roedores e marsupiais ⁽²⁾. Dentre os animais de companhia, cães e gatos têm importância epidemiológica no processo de infecção por vetores, no entanto, nas moradias, o homem e o cão são aproximadamente três vezes mais infectados do que os gatos ⁽³⁾, sendo o cão, a única espécie animal capaz de desenvolver as alterações patológicas crônicas da doença semelhantes à do homem, deixando clara sua importância como principal reservatório doméstico do parasito ⁽⁴⁾.

No ambiente silvestre, mamíferos terrestres e arborícolas têm sido encontrados naturalmente infectados pelo *T. cruzi* em áreas endêmicas da doença de Chagas. Esse fato vem justificando uma recomendação de atenção especial aos animais silvestres capazes de aproximarem das moradias humanas como gambás e roedores. Esse evento, muitas vezes, é facilitado pelo próprio homem que tanto lhes retira o alimento e o abrigo quando altera o meio ambiente ou facilita o encontro de comida com o armazenamento de grãos em construções rústicas. Esses animais podem levar o parasito para o domicílio e para o peridomicílio humano, como também, auxiliar a dispersão dos triatomíneos que podem ser carreados em suas pelagens para outros locais ⁽⁵⁾.

Nesse contexto, é mister salientar que o município de Alfenas está localizado em uma região geográfica que sofreu um grande impacto ambiental com as obras da barragem da hidrelétrica de Furnas que tiveram início em fevereiro de 1957 e foram concluídas em janeiro de 1963, com o represamento das águas do Rio Grande e de seus afluentes. Além disso, a

região é caracterizada pela vocação agropecuária, que exigiu o desmatamento de extensas áreas para o plantio das lavouras de café, de cana-de-açúcar e de laranja. Isso propicia uma intensa corrente migratória nas épocas das safras agrícolas e, por constituir uma importante referência para o ensino superior, também é fator de atração de pessoas de diferentes regiões geográficas do país, inclusive de áreas endêmicas para importantes doenças parasitárias como a doença de Chagas e a esquistossomose.

Dessa forma, há que considerar que as características fisiográficas do município, aliadas às modificações ambientais em curso podem contribuir para alterar a dinâmica populacional dos artrópodes - dentre estes os triatomíneos - podendo, em decorrência, colocar em risco a população humana local ou migrante no sentido de contrair doenças veiculadas por esses insetos.

Sendo assim, o objetivo do estudo foi identificar as espécies de triatomíneos prevalentes na região, verificar a presença do *T. cruzi* e de material genético canino no conteúdo intestinal dos insetos, verificar o envolvimento do cão na manutenção do ciclo biológico desses vetores e em sua distribuição espacial na região em estudo.

Metodologia

Local de estudo

O estudo foi realizado em municípios sob a jurisdição da Superintendência Regional de Saúde de Alfenas (SRS/Alfenas), que é uma Instituição Pública Estadual que compõe a Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, a qual assessora, acompanha e monitora as ações de saúde desenvolvidas em vinte e seis municípios: Alfenas; Alterosa; Arceburgo; Areado; Bandeira do Sul; Botelhos; Campos Gerais; Campo do Meio; Cabo Verde; Carvalhópolis; Conceição da Aparecida; Carmo do Rio Claro; Campestre; Divisa Nova; Fama; Guaranésia; Guaxupé; Juruaia; Machado; Monte Belo; Muzambinho; Nova Resende; Paraguaçu; Poço Fundo; São Pedro da União e Serrania (Figura 1),

Identificação e exame parasitológico dos triatomíneos

O estudo foi realizado no período de julho de 2014 a julho de 2016. Os triatomíneos foram capturados *in loco* pelos agentes de endemias dos municípios, que atuam junto ao Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) ⁽⁶⁾. Foram acondicionados em frascos de polietileno e entregues nas Secretarias Municipais de Saúde, aos cuidados do Serviço de Vigilância em Saúde que os encaminham a SRS/Alfenas. Por meio dos serviços de vigilância epidemiológica os insetos foram entregues no laboratório de Parasitologia Clínica da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), acompanhados de uma ficha com os dados do local de captura, para identificação e exames.

No laboratório, os insetos foram classificados quanto ao hábito alimentar em hemípteros hematófagos, predadores ou filófagos. Os hematófagos (triatomíneos) foram identificados pela análise das suas características morfológicas, quanto ao estágio evolutivo, ao gênero e, se possível, quanto à espécie ⁽⁷⁾. Após a caracterização morfológica foram submetidos ao exame parasitológico do conteúdo do tubo digestivo (fezes) para a pesquisa de

protozoários flagelados com morfologia semelhante ao *T. cruzi*, pela técnica de compressão abdominal. Com as fezes obtidas foram confeccionados esfregaços em solução salina a 0,85% estéril para exame direto a fresco e posterior coloração pelo método de Giemsa.

Exame molecular do conteúdo intestinal dos triatomíneos

As amostras de fezes foram processadas conforme o protocolo básico de extração de DNA descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis ⁽⁸⁾. Resumidamente, as amostras foram maceradas e dissolvidas em tampão de lise (Tris-HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA 10mM; SDS, 0,5%; N-laurilsarcozil, 0,01%; proteinase K, 100mg/mL) e incubadas em banho-maria a 56°C de uma a quatro horas, até a lise completa do material. O DNA foi extraído pelo protocolo fenol/clorofórmio/isoamil e precipitado com isopropanol. O DNA precipitado foi então lavado com etanol a 70% e centrifugado a 10.000g por 10 minutos. O sedimento foi dissolvido em água pura. As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop ND2000 (ThermoScientific) e suas concentrações corrigidas para 250ng/μl.

A identificação molecular do *T. cruzi* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), utilizando-se sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas. As sequências dos iniciadores foram baseadas em regiões do mini-círculo do kDNA do parasito. As sequências foram constituídas pelos iniciadores Tc32F (5'-TTT GGG AGG GGC GTT CA-3') e Tc148R (5'-ATA TTA CAC CAA CCC CAA TCG AA-3'), e pelas sondas Tc71PA-LNA (cepa Tipo I e cepa tipo II) (5'-FAM-CAT "C"TC A"C"C "C"GT A"C"A TT-BHQ-3') e Tc71PC-LNA (cepa tipo I): (5'-VIC CAT "C"TC "C"C"C" CGT ACA TT-BHQ-3') ⁽⁹⁾. As reações foram realizadas em um ABI 7500 Real Time PCR System (AppliedBiosystems), em um volume final de 20μL por reação. O volume de 3μL de DNA (amostras ou controles) foi adicionado a um reagente contendo 10 μL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (NoAmpliErase UNG). Foram ainda adicionados 0,8 μL

dos marcadores Tc32F e Tc148R na concentração de 10 μ M, e 0,4 μ L da sonda Tc71PA-LNA na concentração de 5 μ M e 0,2 μ L Tc71PC-LNA, na concentração de 5 μ M. A cada ciclo de amplificação, foram incluídos dois controles negativos; - um contendo apenas água pura e outro, com DNA extraído de amostra sabidamente negativa para *T. cruzi*; e um controle positivo. A primeira etapa ocorreu em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos para melhor atividade da AmpliErase UNG. A segunda etapa foi um ciclo a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto.

Para verificar se os triatomíneos se alimentaram de sangue humano, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para a caracterização molecular da β globulina humana no conteúdo ingerido pelos triatomíneos. Foram utilizados os oligonucleotídeos β 1 (5' ACC ACC AAC TTC ATC CAC GTT CAC C 3') e β 2 (5' CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3'), que amplificam uma sequência de 140 pares de bases do gene da β globulina humana. As amplificações foram realizadas utilizando-se um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (AppliedBiosystems) e consistiam em um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C; uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão, a 72°C por 1 minuto. Após essa etapa, o processo foi finalizado por um ciclo final de extensão por 10 minutos a 72°C. Cada reação foi acompanhada pela adição de um controle positivo a partir de DNA extraído de sangue humano, e um controle negativo, contendo apenas água pura ⁽¹⁰⁾.

Para verificar o envolvimento do cão na manutenção do ciclo de desenvolvimento dos triatomíneos na região em estudo, foram utilizados marcadores moleculares que amplificam regiões específicas, a gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase (GAPDH) canina (5'AGG CTG AGA ACG GGA AAC TT3' e 5'ATT AAG TTG GGG CAG GGA CT3'), que amplifica um fragmento de 911pb ⁽¹¹⁾.

Exame molecular para pesquisa de DNA de *T. cruzi* no sangue periférico de cães

Foram coletados 5mL de sangue da veia cefálica dos cães das localidades com triatomíneos, cujo exame molecular confirmou a presença do *T. cruzi* no conteúdo intestinal.

As amostras sanguíneas foram processadas conforme protocolo básico de extração de DNA descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis ⁽⁸⁾. Resumidamente, as amostras foram dissolvidas em tampão de lise (Tris-HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA 10mM; SDS, 0,5%; N-laurilsarcozil, 0,01%; proteinase K, 100mg/mL) e incubadas em banho-maria a 56°C de uma a quatro horas, até a lise completa do material. O DNA foi extraído pelo protocolo fenol/clorofórmio/isoamil e precipitado com isopropanol. O DNA precipitado foi então lavado com etanol a 70% e centrifugado a 10.000g por 10 minutos. O sedimento foi dissolvido em água pura. As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop ND2000 (ThermoScientific) e suas concentrações, corrigidas para 250ng/μl.

A identificação molecular do *T. cruzi* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) utilizando-se sondas de hidrólise do tipo TaqMan, conforme protocolo descrito anteriormente.

Processamento dos dados de geotecnologia

Após da obtenção de todos os dados, estes foram utilizados para a elaboração de mapas, por meio das técnicas de geoprocessamento, que determinaram as áreas onde há risco de transmissão do *T. cruzi* para o homem, para animais de companhia, domésticos e silvestres.

Para a elaboração dos mapas foram utilizadas imagens multiespectrais do satélite Landsat – 8 de 03/08/2014 e modelos digitais de elevação (MDE) provenientes da Shuttle Radar Topography Mission (SRTM). As imagens foram obtidas do catálogo de imagens do Earth Explorer do Serviço Geológico dos Estados Unidos (USGS). O MDE foi obtido do Banco de Dados Geomorfométricos do Brasil (Topodata), no endereço eletrônico

www.dsr.inpe.br/topodata. Os softwares utilizados para o geoprocessamento dos dados foram:

o ArcGis 10.2.2, o Ilwis 3.4 e o QGis 2.8.1.

Resultados e discussão

No período de julho de 2014 a julho de 2016, foram recebidos dos municípios que compõem a SRS/Alfenas 572 hemípteros, os quais, de acordo com a classificação alimentar, foram identificados como 560 (97,90%) hematófagos, 2 (0,34%) fitófagos e 10 (1,75%) predadores (Figura 2).

Todos os 560 hematófagos (triatomíneos) foram identificados como *Panstrongylus megistus*, dos quais, 474 (84,64%) foram submetidos ao exame parasitológico.

No Brasil, *P. megistus* foi a espécie mais encontrada, em estudo realizado no período de 2007 a 2011, em análise de ocorrência de triatomíneos domiciliados, do qual participaram aproximadamente 2275 municípios, localizados em regiões não amazônicas. Os resultados obtidos, assim como os obtidos na região estudada, mostraram que os municípios que apresentaram maior número de vetores estavam localizados na região Nordeste do país⁽¹²⁾.

Barbosa e colaboradores⁽¹³⁾ encontraram, no período de 2008 a 2009, dentre 136 insetos identificados em municípios do Estado de São Paulo, gerenciados administrativamente pelos departamentos regionais de saúde de Botucatu, Sorocaba, Campinas, São João da Boa Vista, Barretos, Franca e Ribeirão Preto, a maior porcentagem de *P. megistus*, seguida por *Triatoma sordida*, *R. neglectus* e *P. geniculata*.

Torna-se interessante comentar que *P. megistus* também foi a espécie prevalente em Monte Carmelo-MG em pesquisas realizadas por Fernandes e Costa⁽¹⁴⁾. Mas que, Oliveira, Palmeira e Barbosa⁽¹⁵⁾ mostraram que no período de 2008 a 2012 foram capturados 1.896 exemplares de triatomíneos nos municípios de Curimataú e de Seridó – PA, quando verificaram a presença de *P. megistus* e de outros gêneros e espécies de triatomíneos como *P. lutzi*, *Rhodnius nasutus*, *R. neglectus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. melanocephala* e *T. pseudomaculata*. E que, no Estado de São Paulo, em estudo realizado com a análise dos resultados de atividades desenvolvidas pela Superintendência de Controle de Endemias

(Sucen), no período de 2010 a 2012, foram capturados exemplares de *Triatoma sordida* e de *P. megistus* representando 78,9% e 15,6%, respectivamente, das espécies de triatomíneos coletadas ⁽¹⁶⁾. Esses resultados, embora também mostrassem a presença do *P. megistus*, diferem dos obtidos no estudo, o que pode ser explicado por terem sido realizados em diferentes regiões geográficas do Brasil que, provavelmente, apresentam características biogeográficas diferentes da região estudada.

Na figura 3, verifica-se a distribuição dos exemplares de *P. megistus* quanto ao estágio evolutivo. Observa-se que 328 (58,57%) exemplares correspondiam a esse estágio ninfal e que 146 (26,07%) exemplares eram adultos. A captura de maior número de ninfas pode ser explicada pelas diretrizes do PCDCCh ⁽⁶⁾, pois, a presença dos triatomíneos nesse estágio evolutivo indica que existe a colonização do local, enquanto a presença de triatomíneos adultos pode ocorrer pela atração pela luz ou pelo transporte por meio de objetos para outros locais, iniciando-se então, a formação de uma nova colônia. É válido notar que 86 (15,35%) exemplares estavam secos e sem condições para o exame parasitológico a fresco do conteúdo intestinal e posterior coloração pelo Método de Giemsa, fato que pode ter ocorrido pelo tempo que ocorreu desde o momento da captura do triatomíneo no município e seu transporte até a SRS/Alfenas e ao laboratório para a realização dos exames.

Revisando a literatura, observa-se que proporções diferentes de estágios evolutivos de triatomíneos foram obtidos em estudo realizado em área rural do município de Diamantina-MG por Dias e colaboradores ⁽¹⁷⁾ quando foram encontrados 381 exemplares adultos de *P. megistus* e 95 ninfas. Entretanto, resultados semelhantes aos do estudo realizado foram obtidos por Barbosa e colaboradores ⁽¹³⁾ nos municípios de Barretos, Franca e Ribeirão Preto – SP, nos anos de 2008 e 2009, quando foram capturados 136 exemplares de triatomíneos, sendo 72,7% representados por ninfas.

No quadro 1 pode-se notar que 33 (5,89%) ninfas apresentavam flagelados morfológicamente semelhantes ao *T. cruzi* no conteúdo intestinal e 295 (52,67%) não apresentavam. No mesmo quadro, verifica-se que 15 (2,67%) dos exemplares adultos mostraram protozoários flagelados com morfologia semelhante ao *T. cruzi* e 131 (23,89%) estavam negativos para este protozoário.

Assim como no presente estudo, o monitoramento da infecção por *T. cruzi* em triatomíneos foi realizado por Cominetti e colaboradores ⁽¹⁸⁾ no Estado de Mato Grosso do Sul. Esses autores encontraram 58 (11,3%) espécimes positivos para flagelados com morfologia semelhante ao *T. cruzi* na microscopia, entre 515 exemplares examinados, percentual compatível com o obtido nos municípios estudados. Porém, em 2012 foram observados por Fernandes e Costa ⁽¹³⁾ 119 (52%) insetos positivos em Monte Carmelo-MG, mostrando um índice mais elevado de infecção do que o encontrado nos municípios do presente estudo.

Entretanto, resultados observados por Oliveira; Palmeira; Barbosa ⁽¹⁵⁾ em municípios paraibanos revelaram apenas dois espécimes infectados para flagelados morfológicamente semelhantes ao *T. cruzi*, tanto nos esfregaços a fresco como coradose, os obtidos por Silveira e colaboradores ⁽¹⁹⁾, no sudoeste da Bahia, tiveram 26 (0,29%) positivos para protozoários flagelados e, por Barbosa e colaboradores ⁽¹³⁾ mostraram todos os 136 exemplares de triatomíneos negativos para *T. cruzi* no Estado de São Paulo

Ainda, observando-se resultados expostos no quadro 1, verifica-se que no município de Muzambinho foram capturados 82 (14,54%) triatomíneos e, em Juruáia, 81 (14,46%), sendo esses municípios geograficamente próximos, o que pode ser observado na representação da área de estudo mostrada na figura 1. Nota-se, no mesmo quadro e na mesma figura, que no município de Carmo do Rio Claro foram encontrados 58 (10,3%) triatomíneos

e em Guaranésia 57 (10,1%). Entretanto, esses municípios ficam geograficamente distantes entre si e também distantes dos municípios de Muzambinho e de Juruáia.

Na Figura 4, observa-se a comparação entre os resultados dos exames parasitológicos a fresco que mostraram 48 (10,12%) triatomíneos, independentes do estágio evolutivo, com flagelados morfológicamente semelhantes ao *T. cruzi* no conteúdo intestinal e 77 (16,24%) que apresentaram comprovadamente o *T. cruzi* pela qPCR. A diferença entre os resultados se deve ao fato de que, no exame parasitológico, podem ser visualizados tripanosomatídeos morfológicamente semelhantes ao *T. cruzi* - como o *T. rangeli*, espécie não detectada pelo primer específico para *T. cruzi* utilizado na qPCR. O fato de tripanosomatídeos serem morfológicamente indistinguíveis na microscopia foi relatado por Cominett e colaboradores⁽¹⁸⁾, quando realizaram o monitoramento da infecção pelo *T. cruzi*, utilizando PCR e microscopia, em triatomíneos coletados em municípios do Estado de Mato Grosso do Sul. Já havia também sido comentado por Pizarro e colaboradores⁽²⁰⁾ que mostraram maior sensibilidade e especificidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) do que a microscopia em infecções do *Triatoma infestans* pelo *T. cruzi* em estudo realizado em Chuquisaca, Bolívia.

Nota-se, também, na figura 4, que o município de Juruáia apresentou o maior número de triatomíneos infectados pelo *T. cruzi* na qPCR com 26 reações positivas, o que correspondeu a quinze localidades (fazendas). Seguem-se os municípios de Carmo do Rio Claro com 17 qPCR positivas correspondendo a seis localidades e, de Guaranésia com 10 reações positivas em três localidades, sendo, importante relatar que todas as localidades pesquisadas eram de áreas rurais desses municípios.

Seguindo os objetivos propostos, foi verificado, utilizando-se a qPCR, se os triatomíneos infectados pelo *T. cruzi* se alimentaram de sangue canino ou humano.

A Figura 5 mostra os resultados dos exames, realizados pela qPCR, positivos para a GAPDH (cão). Observa-se que, no município de Guaranésia, 7 (46%) dos triatomíneos se alimentaram com sangue canino. Nessa figura, observa-se também que 4 (27%) dos triatomíneos em Juruáia, 3 (2%) em Nova Resende e 1 (7%) em Poço Fundo se alimentaram de sangue de cão.

Na Figura 6, verifica-se a proporção de triatomíneos que apresentaram GAPDH (cão) e β globulina humana. Nesta, pode ser observado que 13(12%) exemplares se apresentaram positivos para GAPDH (cão), 2 (2%) se apresentaram positivos tanto para GAPDH (cão) como para β globulina humana, sendo importante relatar que 13 (12%) dos triatomíneos apresentaram β globulina humana no conteúdo intestinal. Esses resultados mostram a importância da determinação da fonte alimentar dos triatomíneos e do papel do cão no ciclo biológico do *T. cruzi*, que, circulando no peridomicílio e no domicílio humano, constitui uma ferramenta significativa para a vigilância dos vetores deste protozoário. Valendo a pena ressaltar que fica demonstrado o risco biológico de infecção de animais de companhia e também do homem pelo *T. cruzi*.

É importante notar também nos resultados mostrados na mesma figura, que os 83 (73%) dos conteúdos intestinais de triatomíneos capturados no período estudado não foram reativos pela qPCR, nem para a β globulina humana nem para GAPDH (cão), existindo a possibilidade de os triatomíneos examinados terem utilizado outras fontes alimentares como sangue de bovinos, de caprinos, de aves ou de outros animais, as quais não foram testadas neste estudo.

Torna-se interessante relatar que, em revisão bibliográfica, foram encontrados relatos sobre a determinação da fonte alimentar de triatomíneos utilizando-se a reação da precipitina e não a PCR ou a qPCR. Rodrigues e colaboradores ⁽²¹⁾ mostraram a reatividade para sangue humano em exemplares de *P. megistus* capturados na região de Campinas-SP, fato que pode

ser comparado com os resultados obtidos. Lorosa e colaboradores ⁽²²⁾ em pesquisas feitas no Rio Grande do Sul mostraram que 19,2% dos triatomíneos se alimentaram do sangue de aves; 15,4%, de humano; 10,2%, de roedores e 2,6%, de Gambá, enquanto, Barbosa ⁽¹³⁾, em estudo sobre a doença de Chagas no Estado de São Paulo, a partir de indicadores entomológicos e epidemiológicos do PCDCh desenvolvidos pela SUCEN, observou que, em exemplares de *P. megistus*, espécie que correspondeu a 15,6% dentre as outras coletadas, encontrou sangue de marsupiais e de roedores, sendo que apenas três insetos foram reativos para sangue humano. Porém, em nenhum desses estudos foi pesquisada a ingestão de sangue canino pelos triatomíneos.

Na Figura 7, pode-se observar a dispersão dos triatomíneos infectados pelo *T. cruzi* e de triatomíneos positivos para GAPDH canina nos municípios estudados. Dos vinte e seis municípios que compõem a SRS/Alfenas, quatorze apresentaram localidades (fazendas/sítios), em zona rural, com triatomíneos infectados pelo *T. cruzi*: Alfenas; Alterosa; Botelhos; Cabo Verde; Carmo do Rio Claro; Conceição da Aparecida; Divisa Nova; Guaranésia; Guaxupé; Juruáia; Machado; Nova Resende; Poço Fundo e São Pedro da União.

Nos municípios descritos anteriormente, foram realizadas visitas por médicos veterinários acompanhados de agentes de endemias para a colheita de amostra sanguínea dos cães para a pesquisa de material genético do *T. cruzi*. No entanto, em cinco localidades, não existiam cães. Nas localidades onde o cão estava presente, situadas nos municípios de Guaranésia, Juruáia, Nova Resende e Poço Fundo, todos os proprietários dos animais concordaram com a colheita da amostra sanguínea e com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

Nesses municípios, existiam seis localidades com cães, sendo que em uma delas - localizada no município de Juruáia, existiam dois animais, totalizando nove amostras que foram processadas para a realização da qPCR. Todas as amostras sanguíneas colhidas e

submetidas à pesquisa de material genético do *T. cruzi* estavam negativas, mostrando que nenhum cão apresentava a doença de Chagas.

Resultados diferentes dos obtidos, mas utilizando de outras metodologias para o diagnóstico da doença de Chagas, mostraram cães infectados pelo *T. cruzi* como os descritos por Crisante e colaboradores ⁽²³⁾ na Venezuela - com os testes de aglutinação direta, imunofluorescência indireta (RIFI) e *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e, por Saldaña e colaboradores ⁽²⁴⁾ no Panamá - utilizando o teste rápido (*Trypanosoma cruzi* Detect TM) e ELISA.

Pesquisas realizadas no Brasil, para verificar a infecção pelo *T. cruzi* em cães, também revelaram animais positivos testados pela Imunofluorescência Indireta e ELISA, como as realizadas por Souza e colaboradores ⁽²⁵⁾ em uma comunidade Quilombo do município de Jaraguari-MS, por Mendes e colaboradores ⁽²⁶⁾ com os testes de hemaglutinação indireta, RIFI e ELISA no município de Patos no semiárido paraibano. Entretanto, dentre a bibliografia consultada, somente Almeida e colaboradores ⁽²⁷⁾ mostraram a infecção natural pelo *T. cruzi* de um cão em Cuiabá-MT pela PCR.

Analisando os dados descritos e expostos nas figuras, observa-se que, dentre os municípios onde foram encontrados triatomíneos infectados pelo *T. cruzi* destaca-se Juruáia o qual, também mostrou a presença de material genético de cão – GAPDH canina - no conteúdo intestinal desses insetos. Esse fato deixa claro que o cão participa do ciclo biológico dos triatomíneos na região em estudo, servindo não só como fonte alimentar, mas podendo se infectar pelo *T. cruzi*.

A distribuição geográfica da fauna triatomínica foi identificada por Dias e colaboradores ⁽²⁸⁾ no Estado de Sergipe, por Oliveira e colaboradores ⁽¹⁵⁾ na Paraíba e por Silva e colaboradores ⁽²⁹⁾ no Estado de São Paulo, sendo que a vigilância de ecorregiões positivas para triatomíneos foi estudada por Abad-Franh e colaboradores ⁽³⁰⁾. Silveira e

colaboradores ⁽³¹⁾ mostraram a dispersão de vetores da doença de Chagas no sudoeste da Bahia enquanto, Silva e colaboradores ⁽³²⁾ estudaram a importância da distribuição de triatomíneos em Pernambuco.

Embora, as pesquisas anteriormente mencionadas, tenham sido realizadas em regiões geográficas diferentes do Brasil, todas mostraram a presença dos vetores do *T. cruzi* em municípios estudados, o que se assemelha aos resultados obtidos e confirmam que havendo a presença do triatomíneo e uma fonte alimentar próxima, existe a possibilidade da transmissão do *T. cruzi*, afetando o bem-estar e a sanidade de animais de companhia, domésticos e silvestres.

Conclusão

A espécie de triatomíneo prevalente nos municípios que compõem a SRS/Alfenas é o *Panstrongylus megistus*, espécie autóctone, capaz de colonizar tocas de animais e domicílios humanos e de infectar pelo *T. cruzi*. O protozoário flagelado observado no exame parasitológico, foi confirmado pela qPCR, como sendo o *T. cruzi* presente em conteúdo intestinal de triatomíneos capturados em quatorze municípios. Foi possível a identificação de material genético compatível com DNA canino em algumas amostras de conteúdo intestinal de triatomíneos, o que comprova a participação de cães como fonte de alimentação desses insetos, embora não tenha sido detectado material genético do *T. cruzi* nos cães examinados. A distribuição espacial dos triatomíneos na região do estudo, juntamente com a identificação de sangue canino, confirma que os cães podem estar envolvidos no ciclo biológico desses insetos. Esses dados podem contribuir com a Vigilância Epidemiológica da SRS/Alfenas e dos municípios sob a sua jurisdição, para o estabelecimento de ações rápidas que impeçam ou minimizem o risco de animais de companhia, domésticos, silvestres e do homem se infectarem pelo agente etiológico da doença de Chagas.

Referências

- 1 Mota JC, Camposil MR, Schrami JMA, Costa MFS. Estimativa de taxa de mortalidade e taxa de incidência de sequelas cardíacas e digestivas por doença de Chagas no Brasil, 2008. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2014 ; 23(4):711-20.
- 2 Schmuñis, G. A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: Brener ZA, Andrade Netto MB. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan; 2000. p. 1-15.
- 3 Gurtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*. 2007; 134(Pt 1):69-82.
- 4 Santana VL, Souza AP, Lima DASD, Araújo AL, Justiniano SV, Dantas RP *et al*. Caracterização clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2012 ;32(6):536-41.
- 5 Zetun CB, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Langoni H. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres procedentes de zoológicos do Estado de São Paulo. *Veterinária e Zootecnia*. 2014; 21(1):139-47.
- 6 Vilela MM, Souza JMB, Melo VPD, Dias, JCP. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas em programa de descentralizado: avaliação do conhecimento e práticas de agentes municipais em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2007;23(10):2428-2438.
- 7 Lent H, Wigodzensky P. Revision of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American museum of natural history*. 1979;163(3):123-520.
- 8 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2th ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p. 9.14-9.23.

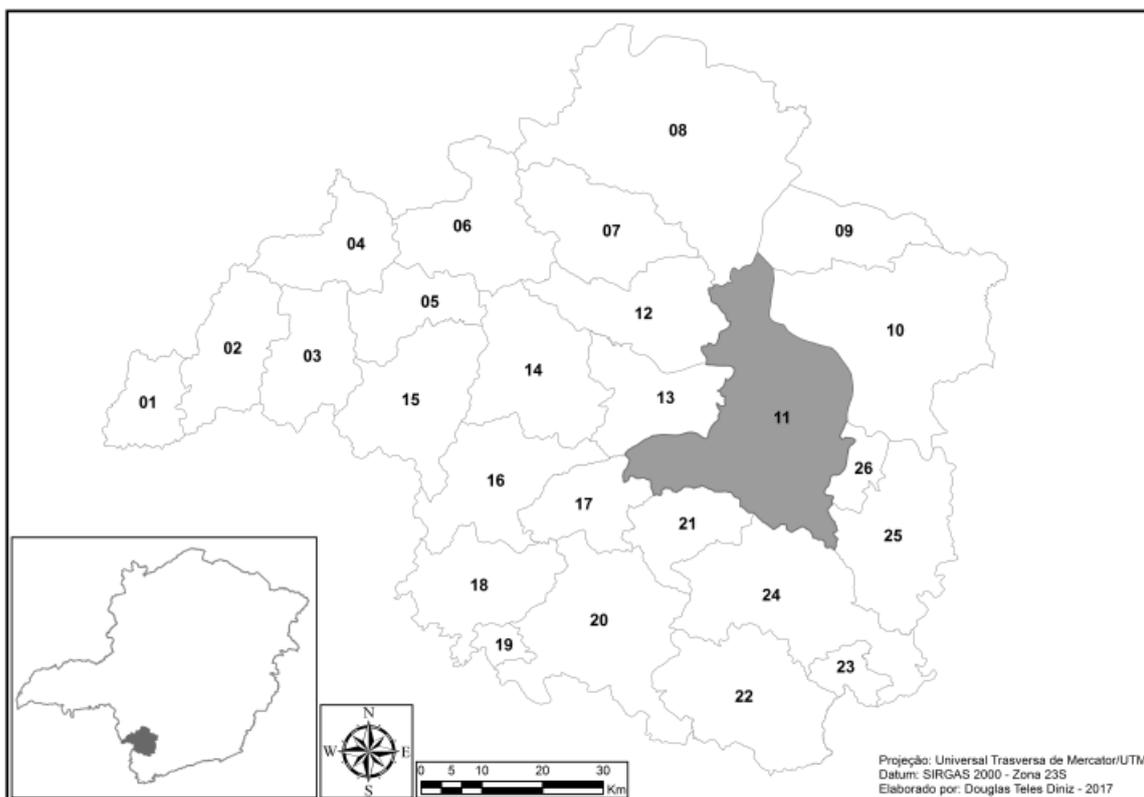
- 9 Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, *et al.* Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2012;6(7):85-91.
- 10 Kullberg M, Nilsson MA, Arnason U, Harley EH, Janke A. Housekeeping genes for phylogenetic analysis of eutherian relationships. Molecular Biology and Evolution. 2006; 23(8):1493-503.
- 11 Vinhaes MC, De Oliveira SV, Reis PO, Lacerda Sousa AC de, Silva RA, Obara MT *et al.* Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* using multi-criteria decision analysis. Acta Tropica. 2014; 137:105-10.
- 12 Barbosa GL, Silva RA, Rodrigues VLCC, Wanderley DMV. Busca ativa de triatomíneos em área com ausência de notificações como subsídio à estratégia de vigilância entomológica no Estado de São Paulo. Boletim Epidemiológico Paulista. 2012; 9(102):4-12.
- 13 Fernandes HM, Costa C. Índice de triatomíneos positivos para *Trypanosoma cruzi*, em Monte Carmelo (MG), no período de 2005 a 2009. Gestão, Tecnologia e Ciências. 2012; 1(1):59-9.
- 14 Oliveira JCP, Palmeira PA, Barbosa VSA. Diversidade, prevalência e infecção natural por tripanosomatídeos em triatomíneos (Hemiptera: reduviidae) do Curimataú e Seridó paraibanos. Revista de Medicina Tropical. 2016 ;45(2):212-26.
- 15 Barbosa GL. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas no estado de São Paulo no período de 2010 a 2012. Epidemiologia e Serviços de Saúde . 2014 ;23(2):259-267.

- 17 Dias JVL, Queiroz DRM, Dioutaiuti L, Pires, HHR. Knowledge of triatomine and of the Chagas disease among people from localities which have different levels of vector infestations. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2016 ;21(7):2293-2303.
- 18 Cominetti MC, de Almeida RFC, Gonçalves GMA, Andreotti R. Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013 ;46(3):277-80.
- 19 Silveira EA, Ribeiro IS, Amorim MS, Rocha DV, Coutinho HS, Freitas LM. Correlation between infection rate of triatomines and Chagas disease in Southwest of Bahia, Brazil: a warning sign? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2016; 88(Suppl 3):1941-1951.
- 20 Pizarro JC, Lucero DE, Stevens L. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector *Triatoma infestans* high rate found in Chuquisaca, Bolívia. *BMC Infect Dis*. 2007 Published online 27 Jun 2007. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1920523/. Acesso em: 15 out 2016.
- 21 Rodrigues VLCC, Casanova C, Baitelo D, Mattos CN, Tonietti VLB. Aspectos relacionados com a infecção por *Trypanosoma cruzi* em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), capturados na região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006; 39:156.
- 22 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. *Entomologia y Vectores*. 2000;7(2):211-225.
- 23 Crisante G, Rojas A, Teixeira MMG, AÑEZ N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Tropica*. 2006 ;98:247-254.

- 24 Saldaña A, Calzada JE, Pineda V, Perea M, Rigg C, Gonzalez K, Santamaria AM, Gottdenker NL, Chaves LF. Risk factors associated with *Trypanosoma cruzi* exposure in domestic dogs from a rural community in Panama. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015; 110(2):936-944.
- 25 Souza AI, Paulino-Junior D, Sousa MG, Camacho AA. Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. *Ciência Rural*. 2008;38(5):1351-1356.
- 26 Mendes RS, Santana VL, Jansesn AM, Xavier SCC, Vidal IF, Rotondano TEF, Souza AP. Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas canina no semiárido paraibano *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2013 ;33(12):1459-1465.
- 27 Almeida ABPF, Paula DAJ, Otton ML, Jaune FW, Cruz RAS, Madeira MF, Nakazato L, Mendonça AJ, Pescador CA, Sousa VRF. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in one dog in central western Brazil: a case report. *Revista do Instituto Brasileiro de Medicina Tropical de São Paulo*. 2013;55(4):287-289.
- 28 Dias DM, Dantas LNA, Dantas, JO. Distribuição geográfica dos vetores da doença de Chagas em Sergipe. *Saber Acadêmico*, 2010; 10:50-60.
- 29 Silva; RA.; Barbosa, GL.; Rodrigues, VLCC. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas no estado de São Paulo no período de 2010 a 2012. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 2014; 23:(2):259-267..
- 30 Abad-Franch F, Gurgel-Gonçalves R, Diotaiuti L, Gurtler R. Reply, on bugs and bias: improving Chagas disease control assessment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109 (1):44-54.

- 31 Silveira EA, Ribeiro IS, Amorim MS, Rocha DV, Coutinho HS, Freitas LM. Correlation between infection rate of triatomines and Chagas disease in Southwets of Bahia, Brazil: a warning sign? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2016 11;88(Suppl 3):1941-1951.
- 32 Silva MBA, Menezes KR, Siqueira AM, Balbino VQ, Lorosa ES, Faria MCG, Freitas M TS, Silva A, Portela VMC, Jurberg J. importância da distribuição geográfica dos vetores da doença de Chagas em Pernambuco, Brasil, em 2012., *Revista de Patologia Tropical*. 2015;44 (2): 195-206.

Figura 1. Municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, com destaque na cor cinza para o município de Alfenas (sede da SRS/Alfenas), no período de julho de 2014 a julho de 2016.



01 Arceburgo; 02 Guaranésia; 03 Guaxupé; 04 São Pedro da União; 05 Juruáia; 06 Nova Resende; 07 Conceição da Aparecida; 08 Carmo do Rio Claro; 09 Campo do Meio; 10 Campos Gerais; 11 Alfenas; 12 Alterosa; 13 Areado; 14 Monte Belo; 15 Muzambinho; 16 Cabo Verde; 17 Divisa Nova; 18 Botelhos; 19 Bandeira do Sul; 20 Campestre; 21 Serrania; 22 Poço Fundo; 23 Carvalhópolis; 24 Machado; 25 Paraguaçu; 26 Fama.

Figura 2. Classificação dos hemípteros, recebidos dos municípios que compõem a SRS/Alfenas, quanto ao hábito alimentar, no período de julho de 2014 a julho de 2016.

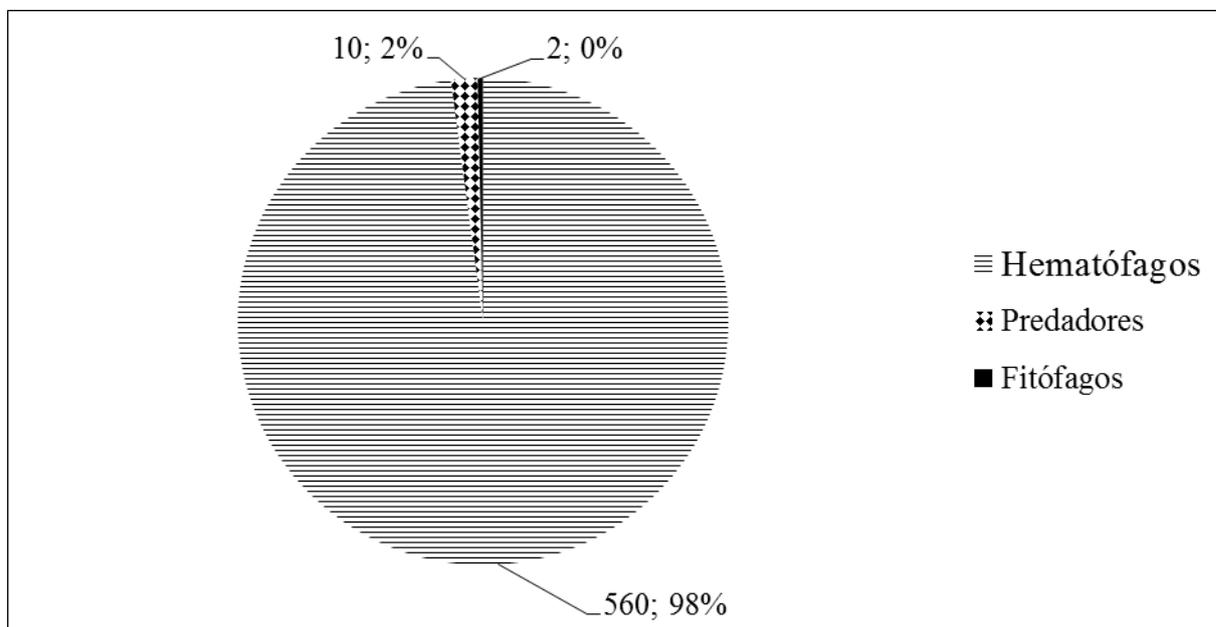
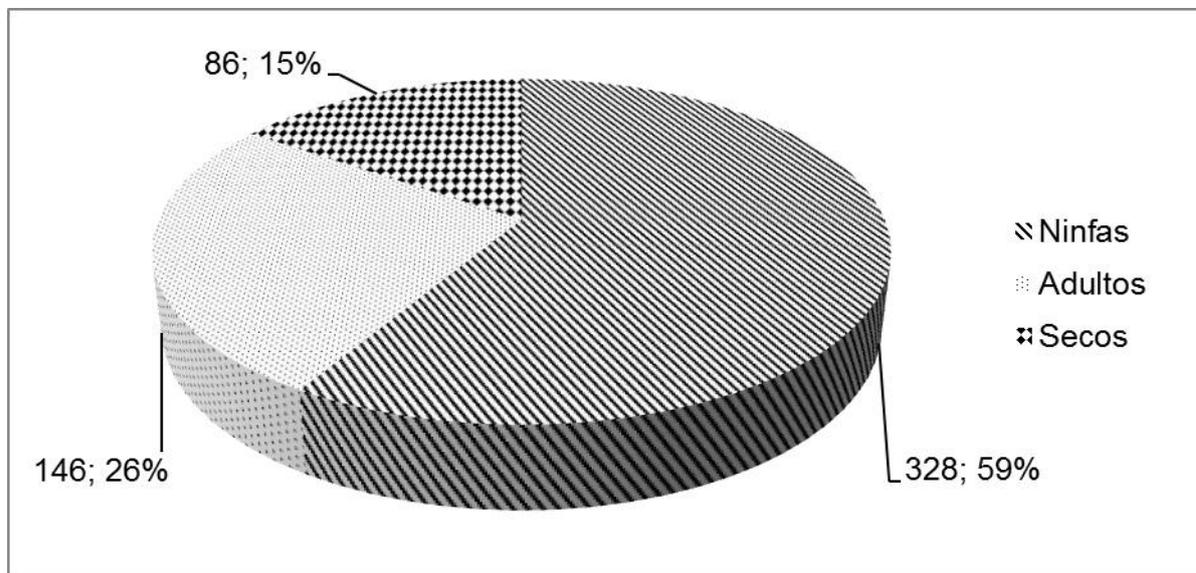


Figura 3. Número e porcentagem de ninfas e adultos de triatomíneos capturados nos municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, no período de julho de 2014 a julho de 2016.



Quadro 1. Estádios evolutivos dos triatomíneos (*P. megistus*) capturados nos municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas e presença de protozoários flagelados morfologicamente semelhantes ao *T. cruzi*, no período de julho de 2014 a julho de 2016.

	Ninfa		Adulto		Seco		Total
	Positivo* N° %	Negativo N° %	Positivo* N° %	Negativo N° %	N° %	N° %	N° %
Alfenas	-	1 - 0,17	1 - 0,17	6 - 1,07	9 - 1,60	17 - 3,03	
Alterosa	-	-	-	2 - 0,35	1 - 0,17	3 - 0,53	
Areado	-	-	-	1 - 0,17	-	1 - 0,17	
Arceburgo	-	8 - 1,42	-	4 - 0,71	4 - 0,71	16 - 2,85	
Bandeira do Sul	-	-	-	-	-	-	
Botelhos	-	4 - 0,71	-	4 - 0,71	1 - 0,17	9 - 1,60	
Cabo Verde	-	21	-	11	10	42	
Campestre	-	-	-	3 - 0,53	-	3 - 0,53	
Campo do Meio	-	-	-	-	-	-	
Campos Gerais	-	1 - 0,17	-	2 - 0,35	-	3 - 0,53	
Carmo do Rio Claro	5 - 0,89	24	1 - 0,17	19 - 3,39	9 - 1,60	58 - 10,3	
Carvalhópolis	-	-	-	-	-	-	
Conceição Aparecida	1 - 0,17	16 - 2,85	3 - 0,53	20 - 3,57	6 - 1,07	46 - 8,21	
Divisa Nova	-	1 - 0,17	-	2 0,35	7 - 1,25	10 - 1,78	
Fama	3 - 0,53	15 - 2,67	-	2 - 0,35	-	20 - 3,57	
Guaranésia	-	47 - 8,39	1 - 0,17	8 - 1,42	1 - 0,17	57 - 10,1	
Guaxupé	-	-	1 - 0,17	2 - 0,35	6 - 1,07	9 - 1,60	
Juruáia	2 - 0,35	48 - 8,57	4 - 0,71	9 - 1,60	18 - 3,21	81 - 14,46	
Machado	-	-	1 - 0,17	1 - 0,17	-	2 - 0,35	
Monte Belo	1 - 0,17	8 - 1,42	2 - 0,35	6 - 1,07	2 - 0,35	19 - 3,3	
Muzambinho	13 - 2,32	35 - 6,25	1 - 0,17	30 - 5,35	3 - 0,53	82 - 14,54	
Nova Resende	4 - 0,71	18 - 3,21	2 - 0,35	12 - 2,14	2 - 0,35	38 - 6,78	
Paraguaçu	-	3 0,53	-	2 - 0,35	1 - 0,35	6 - 1,07	
Poço Fundo	-	19 - 3,39	-	-	8 - 1,42	27 - 4,82	
São Pedro da União	5 - 0,89	42 - 7,5	1 - 0,17	4 - 0,71	3 - 0,53	55 - 9,82	
Serrania	-	-	-	1 - 0,17	1 - 0,17	2 - 0,35	
TOTAL	33 - 5,89	295 - 52,67	15 - 2,67	131 - 23,39	86 - 15,35	560	

* Presença de protozoários flagelados morfologicamente semelhantes ao *T. cruzi*

Figura 4. Exame parasitológico e qPCR dos conteúdos intestinais de triatomíneos capturados nos municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, no período de julho de 2014 a julho de 2016.

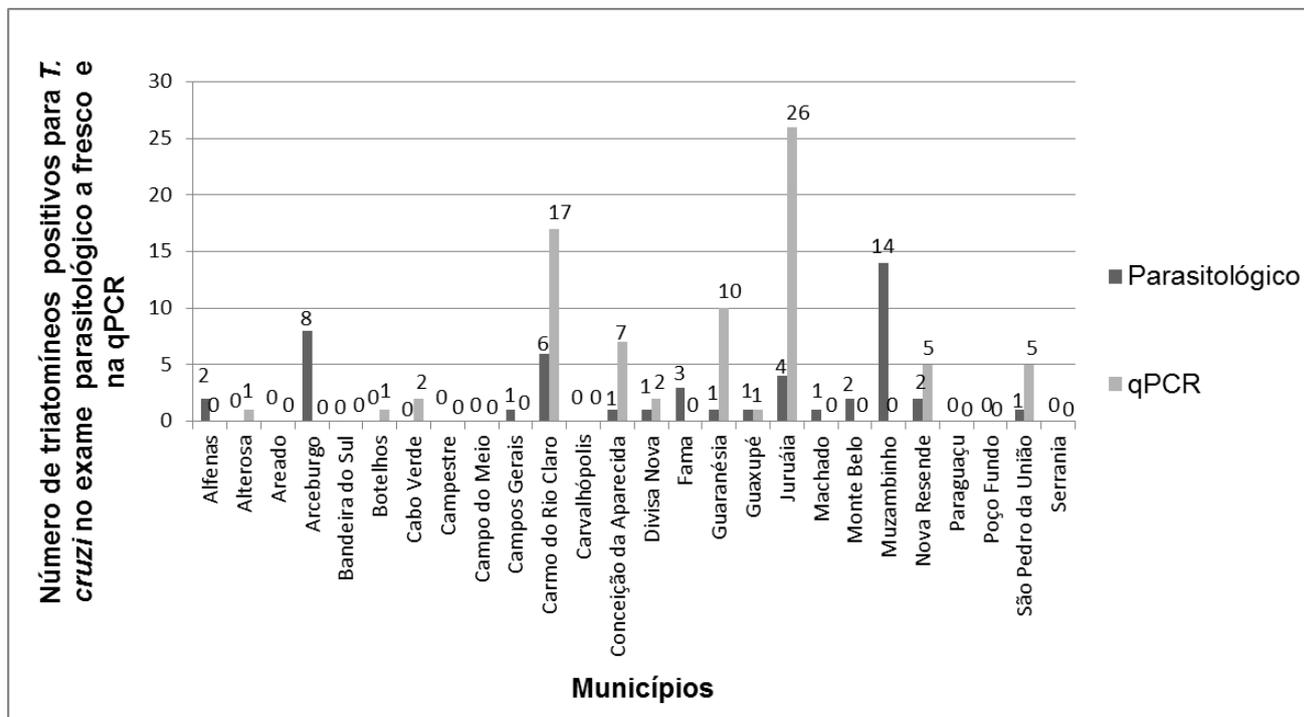


Figura 5. Amostras positivas para GAPDH (cão) de triatomíneos capturados em municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, no período de julho de 2014 a julho de 2016.

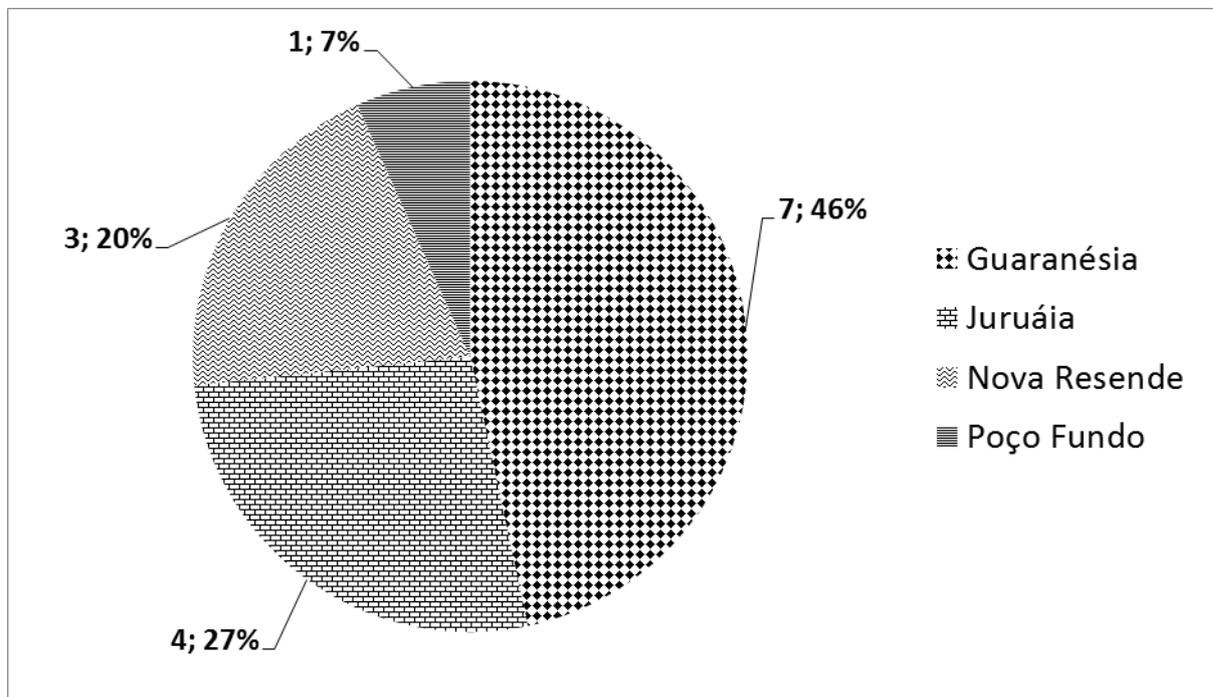


Figura 6. Triatomíneos positivos para GAPDH (cão), β -globulina humana, GAPDH (cão) + β -globulina humana e outras fontes alimentares, capturados nos municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, no período de julho de 2014 a julho de 2016.

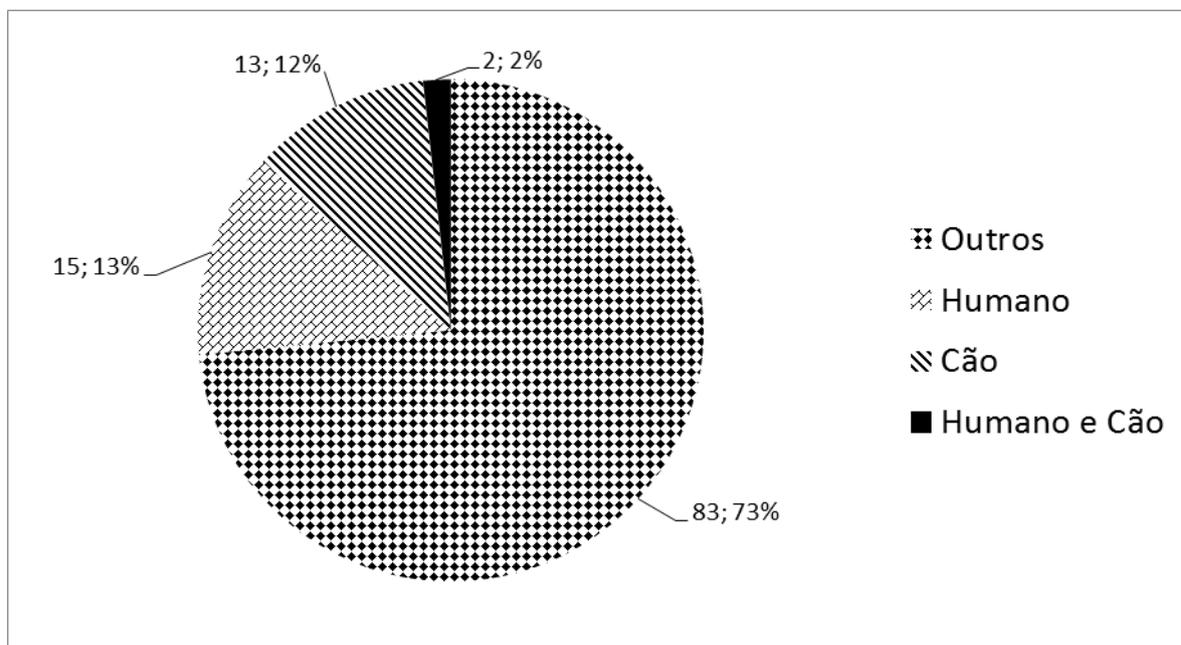
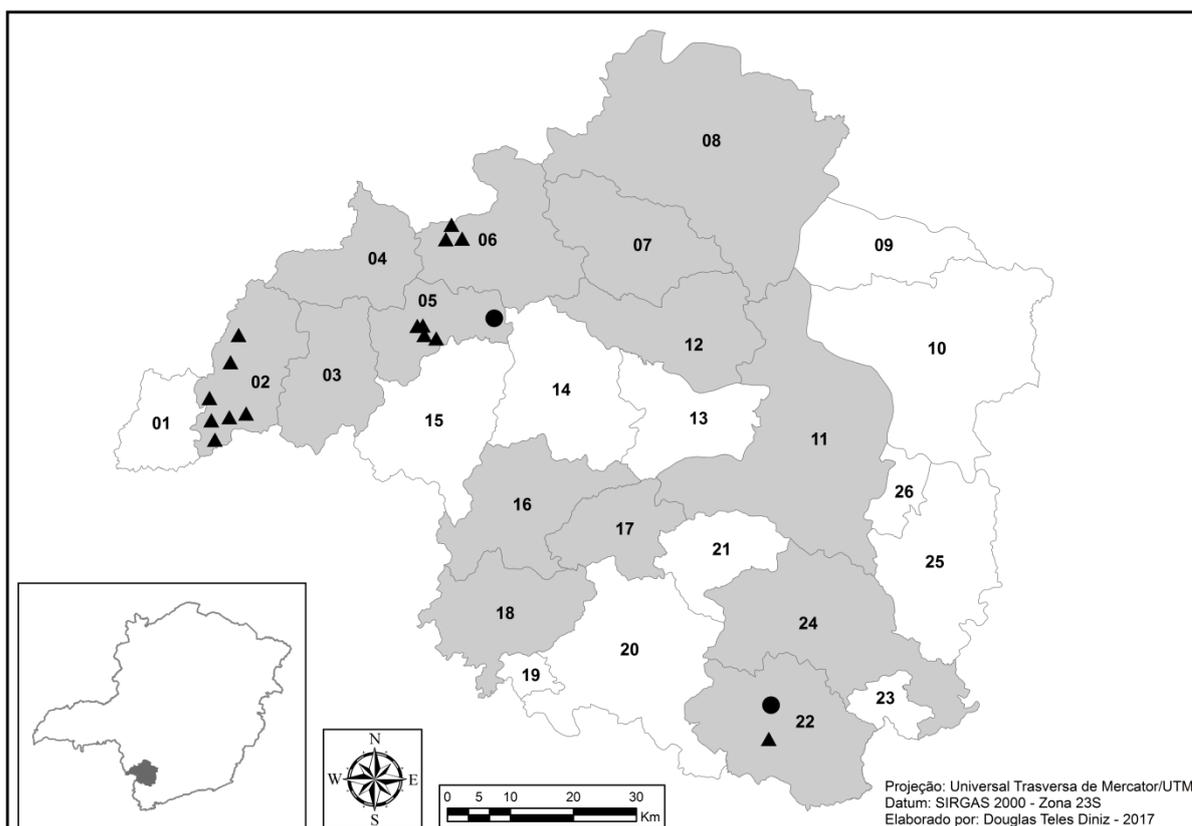


Figura 7. Municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas (nomeados numericamente); municípios que apresentaram triatomíneos infectados pelo *T. cruzi* representados na cor cinza; positivos para GAPDH canina - marcados com triângulos e, positivos para GAPDH canina + β -globulina humana – marcados com bolas, no período de julho de 2014 a julho de 2016.



01 Arceburgo; 02 Guaranésia; 03 Guaxupé; 04 São Pedro da União; 05 Juruáia; 06 Nova Resende; 07 Conceição da Aparecida; 08 Carmo do Rio Claro; 09 Campo do Meio; 10 Campos Gerais; 11 Alfenas; 12 Alterosa; 13 Areado; 14 Monte Belo; 15 Muzambinho; 16 Cabo Verde; 17 Divisa Nova; 18 Botelhos; 19 Bandeira do Sul; 20 Campestre; 21 Serrania; 22 Poço Fundo; 23 Carvalhópolis; 24 Machado; 25 Paraguaçu; 26 Fama.

5 CAPÍTULO 2 - DISPERSÃO GEOGRÁFICA DE TRIATOMÍNEOS EM MUNICÍPIOS QUE COMPÕEM A SUPERINTENDÊNCIA REGIONAL DE SAÚDE DE ALFENAS, NO PERÍODO DE 2000 A 2014

O presente artigo encontra-se de acordo com as normas de submissão exigidas pelo periódico Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Rosângela Vieira Siqueira ⁽¹⁾, Frederico José Moreira Baêta ⁽²⁾, Fernanda Regina Teixeira Mendes⁽²⁾, Juliana Barbosa Nunes ⁽²⁾, Marcos José Marques ⁽²⁾, Ester Caixeta Siqueira Nogueira⁽¹⁾

(1) Universidade José do Rosário Vellano, Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Reprodução Animal, Rodovia MG 179, Km 0, CEP 37130-000 Alfenas, MG, Brasil. E-mail: rosansiqueira@yahoo.com.br, ecaixeta@gmail.com.

(2) Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Biomédicas, R. Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Centro, 37130-000, Alfenas, MG, Brasil. E-mail: marques.prppg@gmail.com, fredbaeta2@gmail.com, fe.reginamendes@gmail.com, juliana_bnunes@yahoo.com.br

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Vigilância Epidemiológica da Superintendência Regional de Saúde de Alfenas.

Coordenação de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde de Alfenas.

Instituto de Prevenção e Diagnóstico J. Janini, Varginha-MG.

Resumo

A doença de Chagas é causada pelo protozoário denominado *Trypanosoma cruzi*, transmitido ao homem e aos animais, principalmente, por hemípteros hematófagos, conhecidos popularmente por barbeiros. Considerando que a colonização do domicílio é fator de risco para a transmissão de *T. cruzi* ao homem e aos animais, é necessário identificar as áreas vulneráveis de transmissão do protozoário. O objetivo do estudo foi conhecer as espécies de triatomíneos prevalentes na região e pesquisar protozoários flagelados morfológicamente semelhantes ao *T. cruzi* em fezes dos triatomíneos nos municípios sob a jurisdição da Superintendência Regional de Saúde de Alfenas. Foi feita a revisão dos registros dos resultados obtidos no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014, arquivados no laboratório da disciplina Parasitologia Clínica da Universidade Federal de Alfenas. Os hemípteros hematófagos foram submetidos ao exame parasitológico do conteúdo do tubo digestivo (fezes) pela técnica de compressão abdominal, para a pesquisa de protozoários flagelados com morfologia semelhante ao *T. cruzi* nos exames parasitológicos. Dentre os hematófagos identificados, 7842 (99,94%) foram caracterizados como *Panstrongylus megistus*, 1 (0,01%) a *P. diasi* e 3 (0,03%) a *Rhodnius neglectus*. Quanto ao estágio evolutivo 4914 (62,66%) eram ninfas e 2359 (30,08%) adultos. Dentre ninfas e adultos, respectivamente, 293 (3,75%) e 274 (3,50%) apresentaram protozoários flagelados morfológicamente semelhantes ao *T. cruzi*. Os resultados mostraram que existem condições favoráveis para que ocorra o ciclo biológico do *T. cruzi* na região, sendo que o processo de captura, de identificação e de exame dos triatomíneos terá maior efetividade na vigilância entomológica, em especial, no que diz respeito ao comportamento e controle vetorial nos municípios estudados.

Palavras chave: Doença de Chagas. Epidemiologia. Hemípteros.

Abstract

Chagas' disease is caused by the protozoan called *Trypanosoma cruzi*, transmitted to man and animals mainly by hematophagous hemiptera of the genera *Triatoma*, *Panstrongylus* and *Rhodnius*, popularly known by barbers. Considering that colonization of the home is a risk factor for the transmission of *T. cruzi* to humans and companion animals, domestic and wild, it is necessary to identify the vulnerable areas of transmission of the protozoan. The objective of the study was to know the triatomine species prevalent in the region and to investigate flagellate protozoa morphologically similar to *T. cruzi* in feces of the triatomines captured by the health agents of the municipalities under the jurisdiction of the Regional Health Superintendence of Alfenas (SRS / Alfenas). Of the 7874 hemiptera received, 7846 (96.64%) were identified as hematophages, 24 (0.39%) as predators and 4 (0.05%) as phytophagous. Among the hematophages identified, 7842 (99,94%) belong to Genus *Panstrongylus* and *megistus* species, 1 (0.01%) to *P. diasi* and 3 (0.03%) to *Rhodnius neglectus*. As for the evolutionary stage 4937 (62.92%) were nymphs and 2363 (30.11%) adults e 546 (6,95%) exemplares estavam secos e não foi feita a distinção do estágio evolutivo. It can be concluded that *P. megistus* is the predominant *T. cruzi* vector in the studied municipalities. In this way, the capture and vector identification process will be more effective in entomological surveillance because the results suggest that the development cycle of the parasite remains in the region.

Key words: Chagas disease. Epidemiology. Hemiptera.

Introdução

Atualmente, no Brasil, os esforços relacionados ao controle vetorial do *Trypanosoma cruzi*, agente etológico da doença de Chagas, são concentrados na vigilância epidemiológica, com o objetivo de manter livres de transmissão às regiões já controladas, impedindo a colonização do peridomicílio e a domiciliação dos triatomíneos ⁽¹⁾.

Considerando que a colonização do domicílio é fator de risco para a transmissão de *T. cruzi* ao homem, aos animais de companhia e silvestres, é necessário identificar as áreas vulneráveis de transmissão do protozoário a partir da correta identificação dos insetos transmissores capturados e da identificação do local da infestação ⁽²⁾.

O *T. cruzi* pode ser transmitido ao homem por diferentes formas, destacando-se a transmissão por triatomíneos infectados. Ainda hoje, a doença de Chagas é considerada como um problema de saúde pública grave em diversos países da América Latina, deslocados de seus ecótopos silvestres pela alteração do meio ambiente ⁽³⁾.

Nesse contexto, é mister salientar que os municípios que compõem a Superintendência Regional de Saúde de Alfenas (SRSAlfenas) estão localizados em uma região geográfica que sofreu um grande impacto ambiental com as obras da barragem da hidrelétrica de Furnas. Além disso, a região é caracterizada pela vocação agropecuária, que exigiu o desmatamento de extensas áreas para o plantio das lavouras de café, de cana-de-açúcar e de laranja. Isso propicia uma intensa corrente migratória nas épocas das safras agrícolas e, por constituir em importante referência para o ensino superior, também é fator de atração de pessoas de diferentes regiões geográficas do país.

Objetivo

Conhecer as espécies de vetores do *Trypanosoma cruzi* prevalentes na região, pesquisar protozoários flagelados com morfologia semelhante a este protozoário em fezes dos triatomíneos em municípios sob a jurisdição da Superintendência Regional de Saúde de Alfenas (SRS/Alfenas), bem como verificar a distribuição geográfica desses hemípteros na região em estudo.

Metodologia

Revisão dos registros dos resultados obtidos com a identificação de hemípteros, realizada no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014, arquivados no laboratório da disciplina Parasitologia Clínica da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Os hemípteros foram capturados por agentes de endemias dos vinte e seis municípios que compõem a Superintendência Regional de Saúde de Alfenas (SRS/Alfenas): Alfenas; Alterosa; Arceburgo; Areado; Bandeira do Sul; Botelho; Campos Gerais; Campo do Meio; Cabo Verde; Carvalhópolis; Conceição da Aparecida; Carmo do Rio Claro; Campestre; Divisa Nova; Fama; Guaranésia; Guaxupé; Juruáia; Machado; Monte Belo; Muzambinho; Nova Resende; Paraguaçu; Poço Fundo; São Pedro da União e Serrania (Figura 1), sendo, a SRS/Alfenas uma Instituição Pública Estadual que compõe a Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais que assessora, acompanha e monitora as ações de saúde desenvolvidas nos municípios sob sua jurisdição.

Os insetos foram capturados por agentes de endemias dos municípios, segundo as diretrizes do Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh), implantado em nível nacional em 1975 por Vilela e colaboradores ⁽⁴⁾. Foram acondicionados em frascos de polietileno e entregues nas Secretarias Municipais de Saúde. Por meio dos serviços de vigilância epidemiológica destas secretarias, os insetos foram enviados à SRS/Alfenas que providenciou o encaminhamento ao laboratório da disciplina Parasitologia Clínica da UNIFAL-MG.

No laboratório, os insetos foram classificados quanto ao hábito alimentar em hemípteros hematófagos, predadores ou filófagos. Os hematófagos (triatomíneos) foram identificados, pela análise das suas características morfológicas, quanto ao estágio evolutivo e ao gênero, segundo Lent e Wygodzinsky ⁽⁵⁾. Após a caracterização morfológica, foram submetidos ao exame parasitológico do conteúdo do tubo digestivo (fezes) pela técnica de

compressão abdominal, para a pesquisa de protozoários flagelados com morfologia semelhante ao *T. cruzi*.

Com as fezes obtidas foram confeccionados esfregaços em solução salina estéril a 0,85% para exame direto a fresco e posterior coloração pelo método de Giemsa ⁽⁶⁾.

Com os resultados obtidos, foi feita a distribuição geográfica dos triatomíneos e dos infectados por protozoários morfológicamente semelhantes ao *T. cruzi* nos municípios de abrangência da SRS/Alfenas.

Resultados e Discussão

No período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014, foram recebidos 7874 hemípteros. Destes, 7846 (96,64%) foram identificados como hematófagos; 24 (0,39%), como predadores e 4 (0,05%), como fitófagos (Figura 2).

Dentre os hematófagos, 7842 (99,94%) pertenciam ao gênero *Panstrongylus* e a espécie *megistus*, 1 (0,01%), a *P. diasi* e 3 (0,03%), a *Rhodnius neglectus* (Figura 3).

É importante comentar que *P. megistus*, de acordo com Gurgel-Gonçalves e colaboradores ⁽⁷⁾, é uma espécie de triatomíneo que pode ser encontrada em todo o país em regiões de Mata Atlântica, em áreas úmidas do Cerrado e da Caatinga, em Estados da Região Sul e Sudeste, em ambientes silvestres ou artificiais, com capacidade de domiciliação, representando a espécie com maior importância epidemiológica.

Foi a espécie mais encontrada, no período de 2007 a 2011, em 2275 municípios, participantes de um estudo em nível nacional, para verificar a dispersão geográfica de triatomíneos em região não amazônica ⁽⁸⁾, fato que se assemelha aos resultados encontrados. Já Barbosa e colaboradores ⁽⁹⁾ encontraram, dentre 230 insetos identificados em municípios das regiões central e nordeste do Estado de São Paulo, coordenados administrativamente pelos departamentos regionais de saúde de Ribeirão Preto, Franca, Barretos, São João da Boa Vista, Campinas, Sorocaba, e Botucatu, a maior porcentagem (90,4%) de exemplares pertencentes ao *Triatoma sordida*, seguido por *P. megistus* correspondendo a 9,6%, diferindo dos resultados encontrados na região em estudo.

Vale salientar que *P. megistus* também foi a espécie prevalente em Monte Carmelo-MG em pesquisas realizadas por Fernandes e Costa ⁽¹⁰⁾, fato que pode ser comparado aos resultados obtidos. Entretanto, Oliveira, Palmeira e Barbosa ⁽¹¹⁾ mostraram que foram capturados 1.896 exemplares de triatomíneos, no período de 2008 a 2012, nos municípios de Curimataú e de Seridó-PA, e sendo encontrados diferentes gêneros e espécies de triatomíneos

como *Panstrongylus lutzi*; *P. megistus*; *Rhodnius nasutus*; *R. neglectus*; *Triatoma brasiliensis*; *T. melanocephala* e *T. pseudomaculata*. No estado de São Paulo, Silva e colaboradores ⁽¹²⁾, no período de 2010 a 2012, dentre 136 insetos capturados, exemplares de *Triatoma sordida* corresponderam a 90,4% e de *P. megistus*, a 9,6%. Espécies diferentes das encontradas nos municípios estudados, com exceção do *P. megistus* e do *R. neglectus*, cuja diferença pode ser explicada pelo fato de os estudos terem sido realizados em diferentes regiões geográficas do Brasil.

Na tabela 1, pode ser observado que, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014 foram recebidos dos municípios que compõem a SRS/Alfenas 7842 exemplares de *P. megistus*. Destes, 4914 (62,66%) correspondiam a ninfas e 2359 (4,02%), a triatomíneos adultos, quando é feita a somatória desses estádios evolutivos independentes da infecção por protozoários flagelados morfologicamente semelhantes ao *T. cruzi*. A explicação para o maior número de ninfas em relação ao número de exemplares adultos decorre das diretrizes do PCDCCh ⁽⁴⁾. A qual, a captura de ninfas é prioritária nesse programa, pois sua presença caracteriza a formação de colônias no local, enquanto os adultos são capazes de deslocar mais em relação às ninfas e, dessa forma, se encontrarem condições adequadas de abrigo e de alimentação, começarem a formar uma nova colônia.

Resultados obtidos com maior número de ninfas do que de adultos foram também obtidos por Barbosa e colaboradores ⁽³⁾ nos municípios de Barretos, Franca e Ribeirão Preto – SP, nos anos de 2008 e 2009, quando foram capturados 136 triatomíneos, dentre os quais 99 eram ninfas. Entretanto, o estudo realizado em Diamantina-MG por Dias e colaboradores ⁽¹³⁾ mostrou que dentre 381 exemplares adultos de *P. megistus*, 95 ninfas foram capturadas mas com a participação comunitária, o que não ocorreu na região estudada onde os triatomíneos foram capturados por agentes de endemias e, não, pela população.

Também na tabela 1, pode-se verificar que 293 (3,75%) ninfas e 274 (3,50%) adultos estavam positivos para protozoários flagelados com morfologia semelhante ao *T. cruzi* no conteúdo intestinal e que 4621 (59,10%) ninfas e 2085 (26,67%) não mostraram esse protozoário. Observa-se na mesma tabela, que dentre os triatomíneos recebidos, 546 (6,98%) estavam secos e sem condições para o exame parasitológico do conteúdo intestinal, não sendo catalogado o estágio evolutivo dos exemplares, o que pode ter acontecido pelo tempo decorrido entre o tempo de envio dos insetos pelos municípios e o recebimento no laboratório para a realização do exame parasitológico.

A figura 4 mostra a somatória de ninfas e adultos positivos (567 – 7,23%), ou seja, que apresentaram protozoários morfologicamente semelhantes ao *T. cruzi*, de triatomíneos negativos (6706 – 85,51%), independentemente do estágio evolutivo e de exemplares secos (546 – 6,98%).

Índice maior de infecção e bem diferente do que o encontrado na região em estudo foi mostrado, em 2012, por Fernandes e Costa ⁽¹⁰⁾ com 119 (52%) insetos positivos em Monte Carmelo-MG e por Cominett e colaboradores ⁽¹⁴⁾, em estudo realizado em Mato Grosso do Sul, com 58 (11,3%) espécimes positivos para flagelados com morfologia semelhante ao *T. cruzi* em um total de 515 triatomíneos capturados.

Entretanto, estudos mostrando um menor percentual de exemplares positivos em relação aos obtidos foram observados por Oliveira, Palmeira e Barbosa ⁽¹¹⁾ em municípios paraibanos cujos exames microscópicos revelaram apenas dois espécimes infectados para flagelados morfologicamente semelhantes ao *T. cruzi*, tanto nos esfregaços a fresco como corados. E também por Silveira e colaboradores ⁽¹⁵⁾, no sudoeste da Bahia, que obtiveram 26 (0,29%) positivos e, por Barbosa e colaboradores ⁽³⁾ que notaram que todos os 136 exemplares de triatomíneos capturados em municípios do Estado de São Paulo estavam negativos.

Voltando a observar a tabela 1, é possível notar que os municípios de Alfenas, Nova Resende e São Pedro da União apresentaram as taxas mais elevadas de triatomíneos enviados para exame correspondendo, respectivamente, a 1113 (14,18%), 873 (11,12%) e 667 (8,5%) exemplares. Considerando o número de triatomíneos que estavam infectados por protozoários morfológicamente semelhantes ao *T. cruzi*, é possível verificar que no município de São Pedro da União foram capturados 58 (0,73%) exemplares. Observando as taxas de ninfas infectadas, seguem os municípios de Muzambinho com 38 (0,48%) e de Nova Resende com 30 (0,38%). Quando se verifica o número de exemplares adultos de triatomíneos que apresentaram as taxas de infecção mais elevadas, verifica-se que os municípios de Nova Resende 38 (0,48%), Monte Belo 35 (0,445) e Muzambinho 24 (0,30%) apresentaram os maiores números e percentuais.

Analisando a figura 5, que mostra o número de triatomíneos recebidos por ano, é possível verificar que em 2003 foi encontrada a maior porcentagem de triatomíneos enviados pelos municípios, com 1019 exemplares identificados e examinados microscopicamente. É importante salientar que exemplares de triatomíneos foram recebidos para exame em todo o período estudado. Um fator que contribuiu para essa demanda foi à resposta adequada aos serviços de epidemiologia da SRS/Alfenas e dos municípios sob sua jurisdição. Mas, é preciso deixar claro que essa demanda não pode ser associada a decisões políticas dos municípios que possam ter interferido no desenvolvimento das atividades inerentes ao programa de controle de vetores da doença de Chagas.

A demanda de triatomíneos para identificação específica e para exame parasitológico, em todos os anos da pesquisa, também foi observada por Oliveira, Palmeira e Barbosa⁽¹¹⁾ em estudo realizado no período de 2008 a 2012 em municípios sob administração da Gerência Regional de Saúde do Curimataú e Seridó Paraibanos e também demonstrada por Fernandes e Costa no município de Monte Carmelo-MG no período de 2005 a 2009⁽¹⁰⁾.

A Figura 6 mostra a distribuição geográfica dos triatomíneos, e também a de infectados por protozoários flagelados com morfologia compatível ao *T. cruzi* nos municípios estudados. Nessa figura, é possível verificar que esses hemípteros foram encontrados, mesmo com apenas 01 (0,01%) exemplar como no município de Bandeira do Sul, em toda a área de abrangência da SRS/Alfenas. Na referida figura é também observado que somente em Campo do Meio não foi encontrado nenhum exemplar infectado por protozoários flagelados, no período estudado.

A distribuição geográfica de triatomíneos foi também pesquisada em diferentes estados brasileiros, mostrando espécies de triatomíneos diferentes das encontradas na região do estudo. Dias, Dantas e Dantas ⁽¹⁶⁾ em municípios do Estado de Sergipe, encontraram além de *P. megistus* e *R. neglectus*, espécies de *T. brasiliensis*; *T. sordida*; *T. melanocephala*; *T. pseudomaculata*; *T. tibiamaculata* e *P. lutzi*. Silveira e colaboradores ⁽¹⁵⁾ mostraram a dispersão de vetores do *T. cruzi* no Sudoeste da Bahia onde encontraram *T. sordida*; *P. geniculatus*; *T. infestans*; *T. pseudomaculata*; *P. lutzi*; *T. melanocephala*; *T. vitticeps*, e *R. Neglectus*. Silva e colaboradores ⁽¹⁷⁾ estudaram a importância da distribuição de triatomíneos em Pernambuco, encontrando *P. megistus*; *P. lutzi*; *T. brasiliensis*; *T. pseudomaculata*, *T. petrochiae* e *T. melanocephala*. Já na região Sudeste, pesquisas realizadas por Silva e colaboradores ⁽¹²⁾ em municípios do Estado de São Paulo no período de 2010 a 2012, coletaram exemplares de *T. sordida*; *P. megistus*; *R. neglectus* e de *T. tibiamaculata* e, Fernandes e Costa ⁽¹⁰⁾ verificaram a presença de triatomíneos em Monte Carmelo-MG, mostrando espécies de *P. megistus*; *P. diasi*; *T. sordida*; *R. neglectus* e de *P. genicula*.

Embora, as pesquisas anteriormente mencionadas, tenham sido realizadas em diferentes regiões geográficas do Brasil, todas mostraram a presença dos vetores do *T. cruzi* nos municípios estudados, assim como os resultados obtidos na jurisdição da SRS/Alfenas.

Conclusão

Pode-se concluir que *P. megistus* é o vetor do *T. cruzi* predominante nos municípios estudados.

Os resultados observados mostram que existem condições favoráveis para que ocorra o ciclo de desenvolvimento do *T. cruzi* na região, com a possibilidade de transmissão para o homem, para animais de companhia, domésticos e silvestres.

Fica clara a importância de os serviços de vigilância epidemiológica exercerem a atividade de sentinela em relação ao controle e profilaxia da doença de Chagas na região estudada.

Dessa forma, o processo de captura e identificação de triatomíneos, seguida da pesquisa de flagelados e a confirmação do *T. cruzi*, terá maior efetividade na vigilância entomológica, em especial, no que diz respeito ao comportamento e ao controle vetorial nos municípios.

Referências

- 1 Almeida EA, Silva EL, Guariento ME, de Souza ML, Aoki FH, Pedro RJ. Evolução fatal da coinfeção doença de Chagas/AIDS: dificuldades diagnósticas entre a reagudização da miocardite e a miocardiopatia chagásica crônica. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2009;42(2):199-02.
- 2 Paula MBC, Costa IN, Freitas PA, Limongi JE, PAJUABA NETO AA, Pinto RMC, Gonçalves, Costa-Cruz, JM. Ocorrência e positividade para *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos de municípios da região sudeste do Brasil de 2002 a 2004. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2010;43(1):9-14.
- 3 Barbosa GL, Silva RA, Rodrigues VLCC, Wanderley DMV. Busca ativa de triatomíneos em área com ausência de notificações como subsídio à estratégia de vigilância entomológica no Estado de São Paulo. BEPA, 2012;9(102):4-12.
- 4 Vilela MM, Souza JMB, Melo VPD, Dias, JCP. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas em programa de descentralizado: avaliação do conhecimento e práticas de agentes municipais em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. Cad Saúde Pública. 2007 ;23(10):2428-38.
- 5 Lent H, Wigodzinsky P. Revision of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bulletin of the American museum of natural history. 1979;163(3):123-520.
- 6 De Carli GA. Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2ed. São Paulo: Atheneu; 2007.
- 7 Gurgel-Gonçalves, RG. *et al.* Geografic distribution of Chagas disease vectores in Brazil based on ecological niche modeling. J Tropic Med ; 2012, p. 1-15, 2012. Disponível em://http://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/705326/. Acesso em: 22 ago 2016.

- 8 Vinhaes MC, de Oliveira SV, Reis PO, de Lacerda Sousa AC, Silva RA, Obara MT *et al.* Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* using multi-criteria decision analysis. *Acta Tropica*, 2014;137:105-10.
- 9 Barbosa GL. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas no estado de São Paulo no período de 2010 a 2012. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2014;23(2):259-267.
- 10 Fernandes HM, Costa C. Índice de triatomíneos positivos para *Trypanosoma cruzi*, em Monte Carmelo (MG), no período de 2005 a 2009. *GETEC*. 2012;1(1):59-9.
- 11 Oliveira JCP, Palmeira PA, Barbosa VSA. Diversidade, prevalência e infecção natural por tripanosomatídeos em triatomíneos (Hemiptera:reduviidae) do Curimataú e Seridó paraibanos. *Revista de Patologia Tropical*, 2016;45(2):212-26.
- 12 Silva RA, Barbosa GL, Rodrigues VLCC. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas no estado de São Paulo no período de 2010 a 2012. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2014;23(2):259-67.
- 13 Dias JVL, Queiroz DRM, Dioutaiuti L, Pires, HHR. Knowledge of triatomine and of the Chagas disease among people from localities which have different levels of vector infestations. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2016;21(7):2293-2303.
- 14 Cominetti MC, de Almeida RFC, Gonçalves GMA, Andreotti R. Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomíneos using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013;46(3):277-80.
- 15 Silveira EA, Ribeiro IS, Amorim MS, Rocha DV, Coutinho HS, Freitas LM. Correlation between infection rate of triatomines and Chagas disease in Southwest of Bahia, Brazil: a warning sign? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2016 11;88(Suppl 3):1941-1951.
- 16 Dias DM, Dantas LNA, Dantas, JO. Distribuição geográfica dos Vetores de Chagas em Sergipe. *Saber Acadêmico*, 2010;10:50-60.

- 17 Silva, MBA *et al.* Importância da distribuição geográfica dos vetores da doença de chagas em Pernambuco, Brasil, em 2012. *Revista de Patologia Tropical*. 2015;44(2):195-206.

Figura 1. Municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.

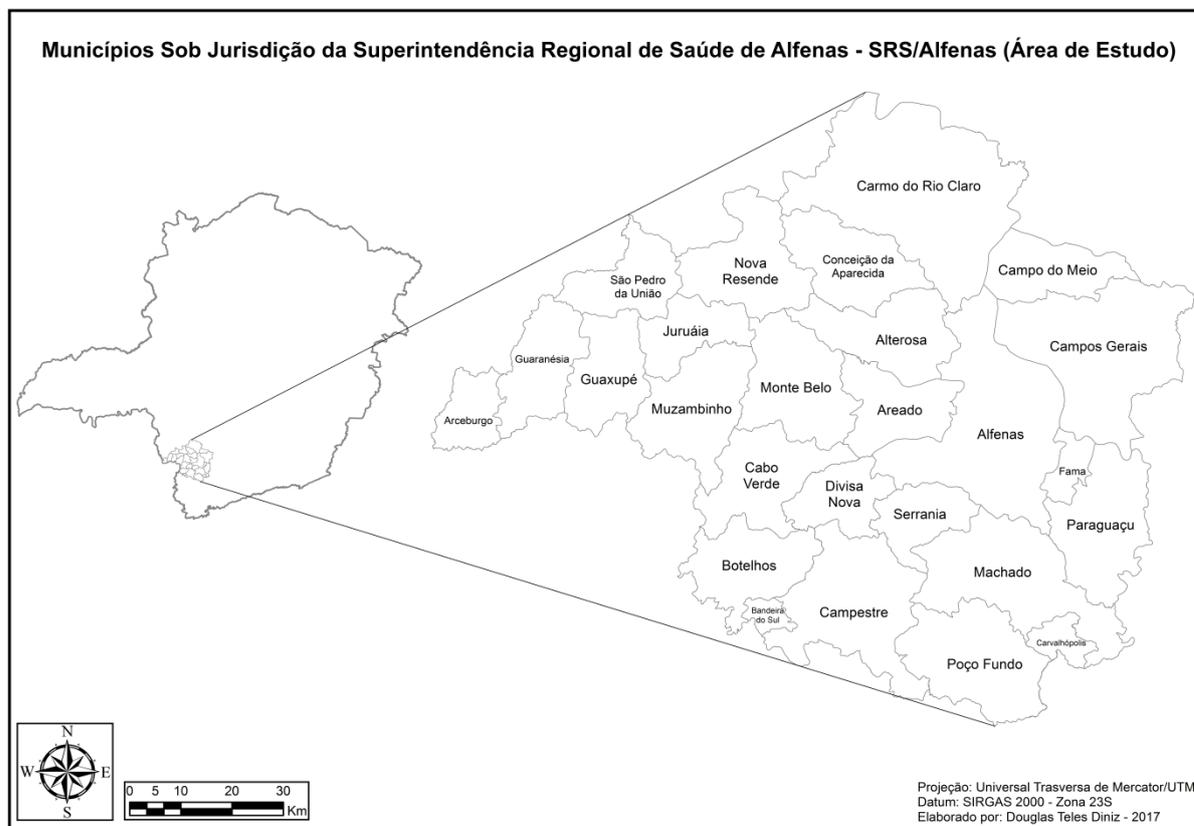


Figura 2. Classificação dos hemípteros recebidos dos municípios que compõem a SRS/Alfenas quanto ao hábito alimentar, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.

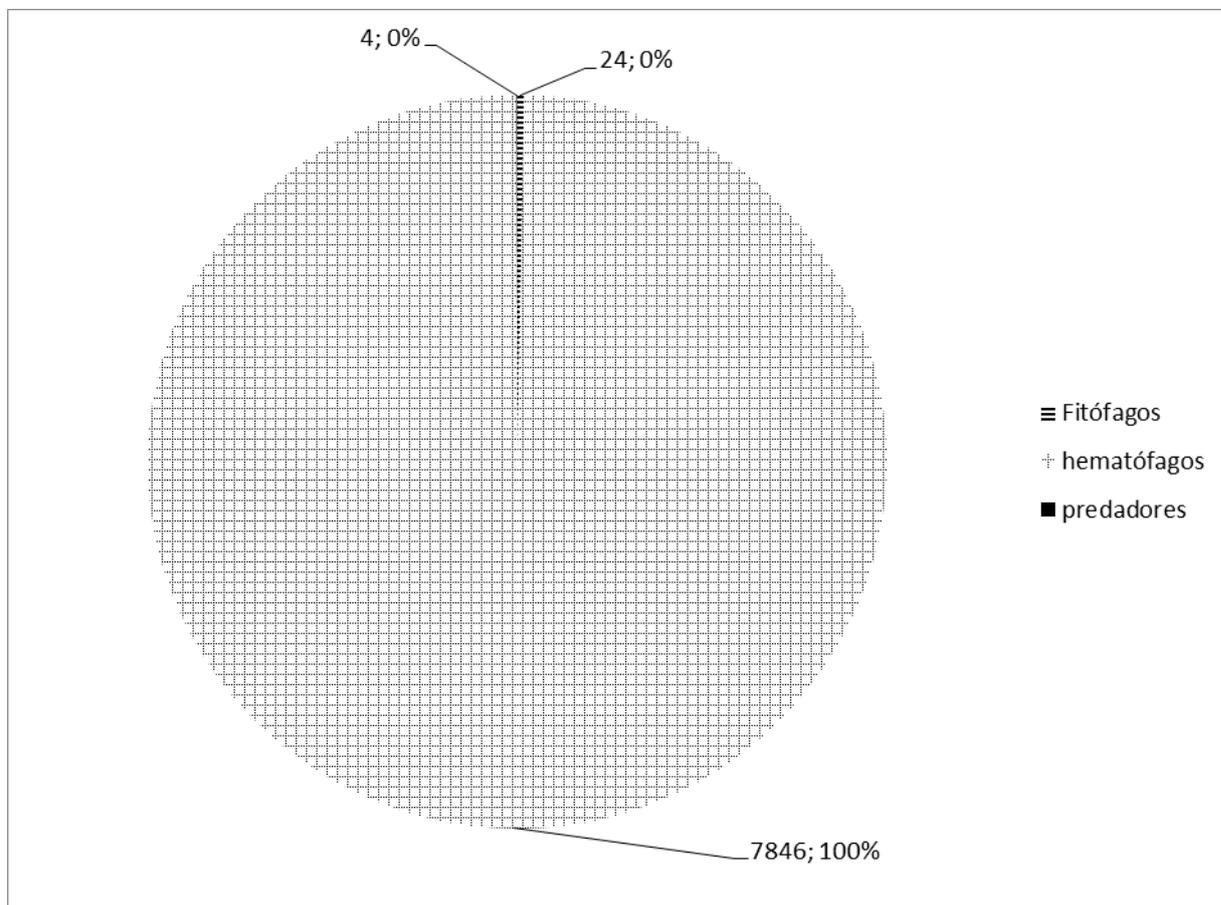


Figura 3. Distribuição quanto ao gênero e espécie de triatomíneos capturados em municípios que compõem a SRS/Alfenas, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.

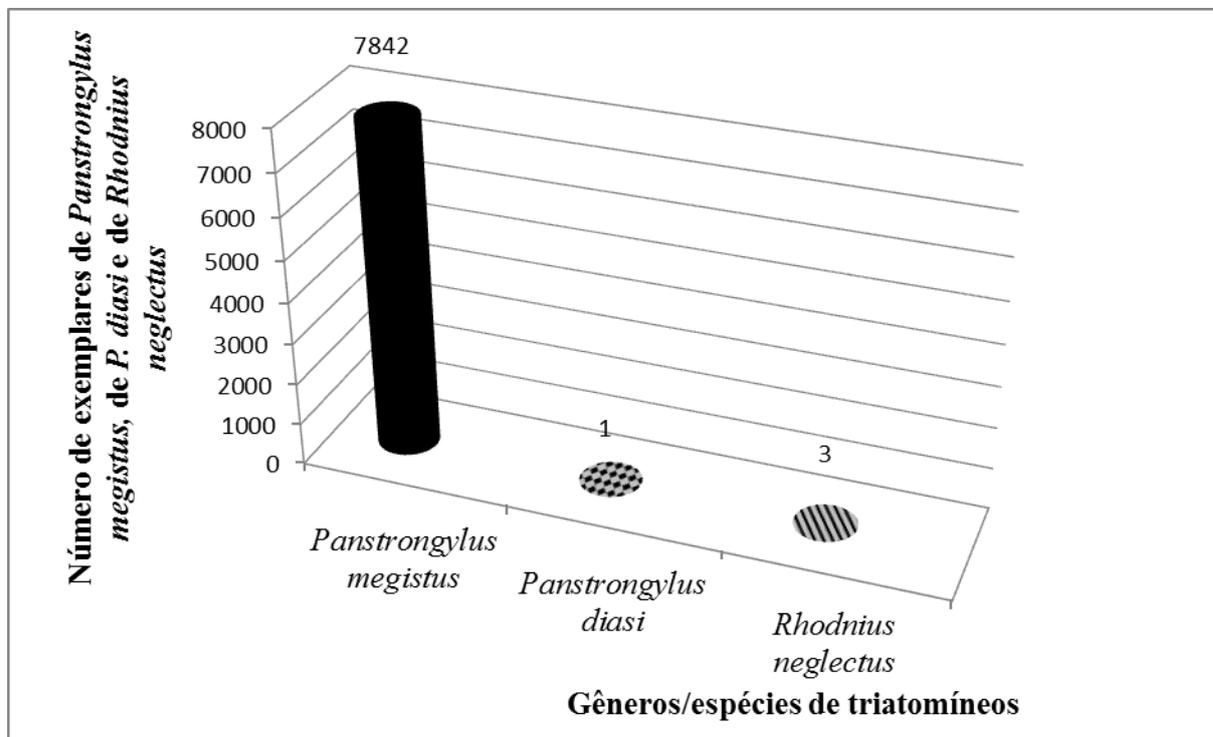


Tabela 1. Estádios evolutivos e presença de protozoários flagelados morfologicamente semelhante ao *T. cruzi* capturados em municípios que compõem a SRS/Alfenas.

<i>Panstrongylus megistus</i>						
Municípios	Triatomíneos com conteúdo intestinal examinado				Triatomíneos com conteúdo intestinal não examinado (seco)	Total (N°;%)
	Ninfa		Adulto		(N°;%)	
	Positivo (N ;%)	Negativo (N°;%)	Positivo (N°;%)	Negativo (N°;%)		
Alfenas	-	682; 8,72	4; 0,05	224; 2,86	203; 2,60	1113; 14,23
Alterosa	11; 0,14	412; 5,27	9; 0,12	142; 1,82	43; 0,55	617; 7,89
Areado	13; 0,17	128; 1,64	5; 0,06	53; 0,68	9; 0,12	208; 2,66
Arceburgo	1; 0,01	35; 0,45	5; 0,06	38; 0,49	15; 0,19	94; 1,20
Bandeira do Sul	1; 0,01	-	-	-	-	1; 0,01
Botelhos	-	50; 0,64	6; 0,08	61; 0,78	29; 0,37	146; 1,87
Cabo Verde	-	44; 0,56	6; 0,08	51; 0,65	7; 0,09	108; 1,38
Campestre	10; 0,13	102; 1,30	-	32; 0,41	3; 0,04	147; 1,88
Campo do Meio	-	-	--	16; 0,20	-	16; 0,20
Campos Gerais	-	9; 0,12	5; 0,06	13; 0,17	1; 0,01	28; 0,36
Carmo do Rio Claro	16; 0,20	304; 3,89	19; 0,24	128; 1,64	31; 0,40	498; 6,37
Carvalhópolis	11; 0,14	50; 0,64	2; 0,03	15; 0,19	2; 0,03	80; 1,02
Conceição Aparecida	15; 0,19	277; 3,54	20; 0,26	200; 2,56	36; 0,46	548; 7,01
Divisa Nova	2; 0,03	30; 0,38	15; 0,19	65; 0,83	8; 0,10	120; 1,53
Fama	-	30; 0,38	2; 0,03	43; 0,55	4; 0,05	79; 1,01
Guaranésia	11; 0,14	241; 3,08	15; 0,19	150; 1,92	5; 0,06	422; 5,40
Guaxupé	4; 0,05	27; 0,35	12; 0,15	68; 0,87	4; 0,05	115; 1,47
Juruáia	11; 0,14	209; 2,67	17; 0,22	82; 1,05	6; 0,08	325; 4,16
Machado	15; 0,19	38; 0,49	1; 0,01	20; 0,26	14; 0,18	88; 1,13
Monte Belo	1; 0,01	119; 1,52	35; 0,45	105; 1,34	46; 0,59	306; 3,91
Muzambinho	38; 0,49	263; 3,36	24; 0,31	149; 1,91	20; 0,26	494; 6,32
Nova Resende	30; 0,38	692; 8,85	38; 0,49	98; 1,25	15; 0,19	873; 11,17
Paraguaçu	2; 0,03	90; 1,15	13; 0,17	23; 0,29	10; 0,13	138; 1,76
Poço Fundo	29; 0,37	352; 4,50	6; 0,08	121; 1,55	16; 0,20	524; 6,70
São Pedro da União	58; 0,74	420; 5,37	13; 0,17	166; 2,12	10; 0,13	667; 8,53
Serrania	14; 0,18	17; 0,22	2; 0,03	22; 0,28	9; 0,12	64; 0,82
Total	293; 3,75	4621; 59,10	274; 3,50	2085; 26,67	546; 6,98	7819; 100,00

Figura 4. Triatomíneos positivos (com protozoários flagelados com morfologia semelhante ao *T. cruzi*), negativos e secos, capturados nos municípios que compõem a SRS/Alfenas, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.

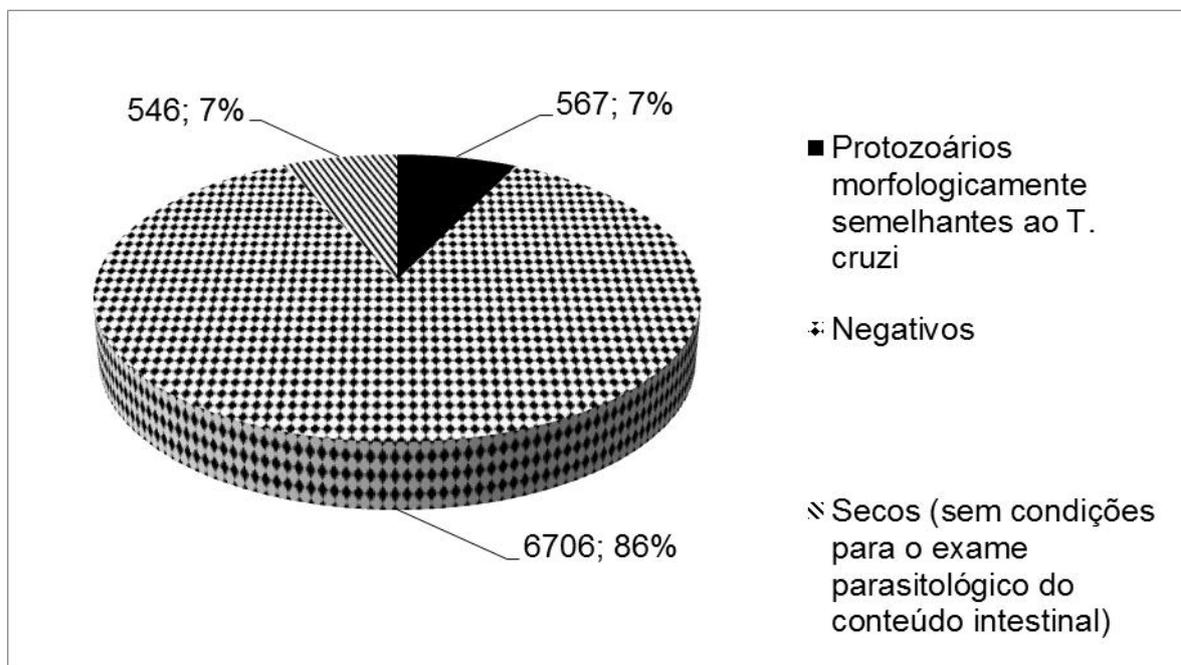


Figura 5. Triatomíneos recebidos, por ano de estudo, dos municípios que compõem a SRS/Alfenas, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.

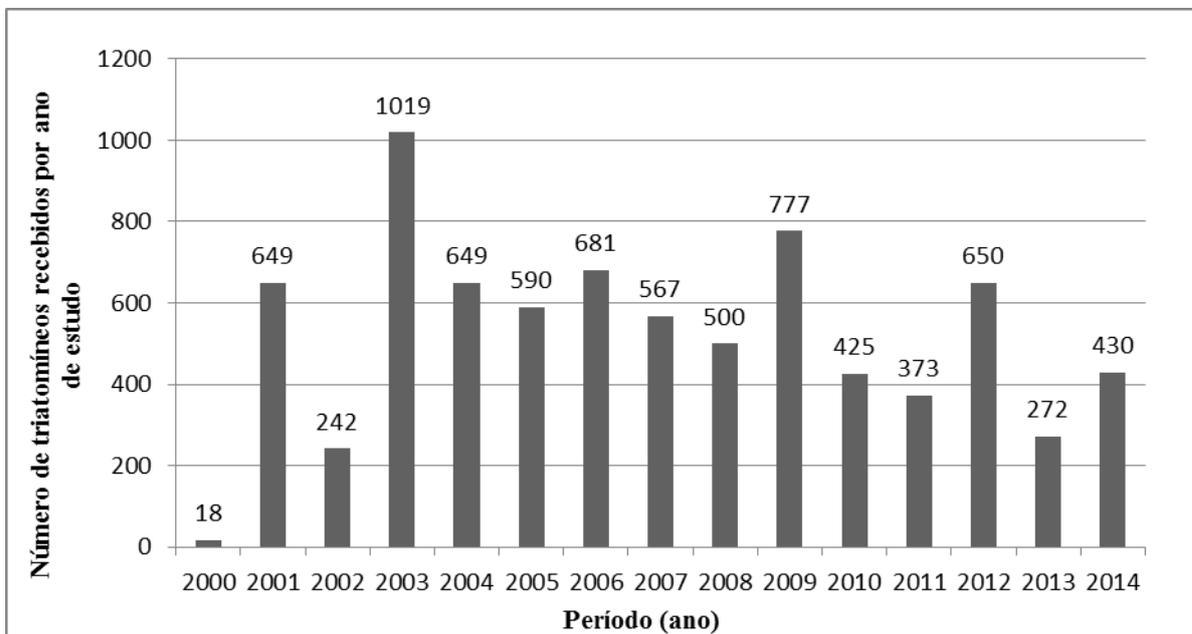
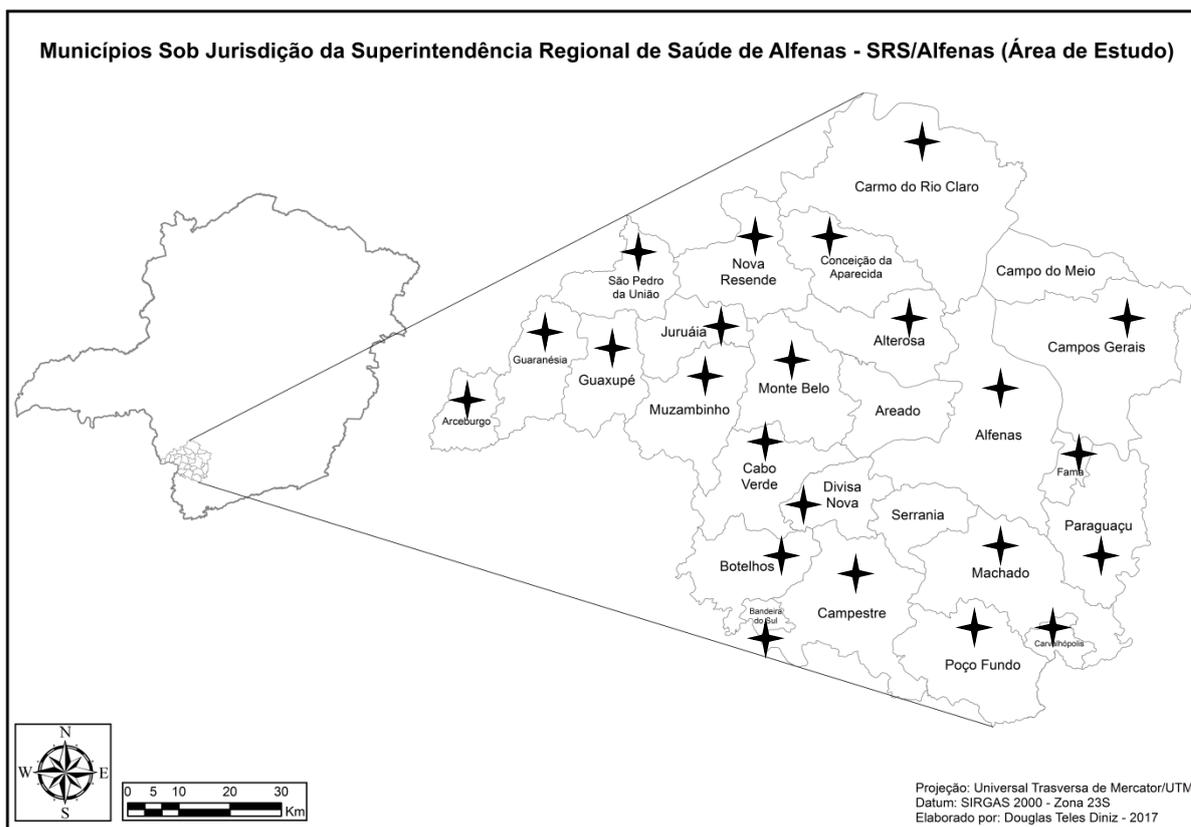


Figura 6. Distribuição geográfica de triatomíneos com protozoários flagelados morfologicamente semelhantes ao *T. cruzi*, em municípios sob a jurisdição da SRS/Alfenas, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2014.



01 Arceburgo; 02 Guaranésia; 03 Guaxupé; 04 São Pedro da União; 05 Juruáia; 06 Nova Resende; 07 Conceição da Aparecida; 08 Carmo do Rio Claro; 09 Campo do Meio; 10 Campos Gerais; 11 Alfenas; 12 Alterosa; 13 Areado; 14 Monte Belo; 15 Muzambinho; 16 Cabo Verde; 17 Divisa Nova; 18 Botelhos; 19 Bandeira do Sul; 20 Campestre; 21 Serrania; 22 Poço Fundo; 23 Carvalhópolis; 24 Machado; 25 Paraguaçu; 26 Fama.

★ Triatomíneos com protozoários flagelados morfologicamente semelhantes ao *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F. *et al.* Reply, on bugs and bias: improving Chagas disease control assessment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 1, p.125-130, fev. 2014.

ABRÃO, D. C. *et al.* Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no Estado de Minas Gerais. **Ciência Animal Brasileira**, Suplemento I, p. 672-676, 2009.

ABRÃO, D. C. *et al.* Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no Estado de Minas Gerais. In : Anais do VIII CONGRESSO BRASILEIRA DE BUIATRIA, 7., Belo Horizonte, 2009.

ALARCÓN, C. **Evaluación del efecto combinado de los parámetros temperatura y humedad relativa sobre la eclosión de los huevos de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) y la capacidade parasitaria de *Ooencyrtus trimidadensis* (Hymenoptera, Encyrtidae)**. 1980. 109. Tesis (Licenciatura)- Univ. Simón Bolívar, Caracas, 1980.

AGUILAR, H. M. *et al.* Chagas disease in the Amazon region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n.1, p. 47-56, out. 2007. Suplemento.

ALMEIDA, E.A *et al.* Evolução fatal da coinfeção doença de Chagas/AIDS: dificuldades diagnósticas entre a reagudização da miocardite e a miocardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 199-202, mar/abr. 2009.

ALMEIDA, A. B. P. F. *et al.* Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in one dog in Central Western Brazil: a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 4, p. 287-289, july/ aug. 2013.

ARGOLO, A.M. *et al.* **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Fundação Oswaldo Cruz. Programa Integrado de Doença de Chagas (PICD). Rio de Janeiro : Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 2008.

BARBOSA *et al.* Busca ativa de triatomíneos em área com ausência de notificações como subsídio à estratégia de vigilância entomológica no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, [online], v. 9, n. 102, p. 4-12, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.pesquisa.bvsalud.org/bvsvs/resource/pt/ses-28030>>. Acesso em: 02 ago 2013.

BARBOSA, G. L. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas no estado de São Paulo no período de 2010 a 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 259-267, jun. 2014.

BATISTA, J. S. *et al.*, Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira** [on line], v. 28, n. 1, p. 63-69, 2008. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008000100010>>. Acesso em: 08 jun 2015.

BELTRÃO, H. D. E. B. *et al.* Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. **Tropical Doctors**, London, v. 39, n. 4, p. 231-232, oct. 2009.

BOSE, R. *et al.* Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by Tabanidae. **Parasitology Research**, Berlin, v. 73, n.5, p.421-424, 1987. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3658973>>. Acesso em: 08 jun 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília, 2009. 806 p. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_>. Acesso em 10 abr. 2012.

BRUN, R.; HECKER, H; LUN, Z. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 79, n. 2, p. 95-107, oct. 1998.

CADIOLI *et al.* First report of *Trypanosoma vivax* in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 118-124, apr./june 2012.

CAVALCANTI *et al.* Microepidemia de doença de Chagas aguda por transmissão oral no Ceará. **Cadernos de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 911-921, out-dez. 2009.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 159-218, aug. 1909.

CARCAVALHO, R. U. *et al.* **Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas**. Rio de Janeiro : FIOCRUZ, 1997.v.3.

CARVALHO *et al.* Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, jun. 2008. Disponível em: <http://www.Scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352008000300037&script=sci_arttext>. Acesso em: 19 maio 2015.

CIDEIM (Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas). **Manual de Entomología Médica para Investigadores de America Latina**. Colombia, 1994.

CLARK, N. The effect of temperature and humidity upon the eggs of the bug *Rhodnius prolixus* (Heteroptera, Reduviidae), **Journal of Animal Ecology**, British, v. 4, n. 1, p. 82-87, may 1935.

COMINETTI, M. C. *et al.* Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomíneos using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 46, n. 3, p. 27-80, may/june 2013.

COURA, J. R.; VIÑAS, P.P. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, [online], v. 465, n. 7301, p. 56-7, Jun, 2010. Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7301_supp/full/nature09221.html>. Acesso em: 02 ago 2015.

CRISANTE, G. et al. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. **Acta Tropica**, Hamburg, v. 98, n. 3, p. 247-254, July 2006.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

DIAS, J. P. C. Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, (Suplemento), p. 165-169, nov/dez. 2001.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 2020-2021, out. 2006.

DIAS, D. M.; DANTAS, L. N. A.; DANTAS, J. O. Distribuição geográfica dos Vetores de Chagas em Sergipe. **Saber Acadêmico**, São Paulo, v. 10, p. 50-60, dez. 2010.

DIAS, J. C. P. Os primórdios do controle da doença de Chagas (em homenagem a Emmanuel Dias, pioneiro do controle, no centenário de seu nascimento). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 2, p. 12-18, jan/fev. 2011. Suplemento.

DIAS, J. V. L. *et al.* Knowledge of triatomine and of the Chagas disease among people from localities which have different levels of vector infestations. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 7, p. 2293-2303, July 2016.

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, p. 7-86, Jun. 2016. Edição Especial.

DINIZ, M. L. **Barbeiros contaminados com doença de Chagas são encontrados no DF**. 2016. [on line]. Disponível em<: <http://www.unbciencia.unb.br/biologicas/54-medicina/469-pesquisa-encontra-barbeiros-contaminados-com-a-doenca-de-chagas>>. Acesso em: 20 jun.2016.

FERNANDES, H. M.; COSTA, C. Índice de triatomíneos positivos para *Trypanosoma cruzi*, em Monte Carmelo (MG), no período de 2005 a 2009. **Gestão, Tecnologia e Ciências**, [on line], v. 1, n. 1, p. 59-9, 2012. Disponível em:<http://www.fucamp.edu.br/editora/index.php/getec/about/contact>. Acesso em: 02 ago 2015.

FIQUEIREDO, J. F.; SILVA, L. C.; BOLOGNEZ, C. A. Influência das agressões ecológicas na migração de triatomíneos (hemíptera:reduviidae), para os ecótopos artificiais criados pelo homem em municípios do Estado de Mato Grosso. **Biodiversidade**, [on line], v. 6, n. 1, p. 52-61, 2007. Disponível em: <http://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/biodiversidade/index>. Acesso em: 15 ago 2015.

FORATTINI, O. P. *et al.* Aspectos ecológicos da tripassomíase americana. VI — Persistência do *Triatoma sordida* após alteração ambiental e suas possíveis relações com a dispersão da espécie. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 265-282, set. 1974.

FORATTINI, O. P. *et al.* Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana XV. Desenvolvimento, variação e permanência da *Triatoma sordida* e de *Panstrongylus megistus* espontaneamente desenvolvidas em ecótopos artificiais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 299-313, jun. 1979.

FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Revista de Saúde Publica**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 964-98, dez. 2006.

FRIEND, W. G.; SMITH, J. J. B. Factores biológicos y ecológicos em la enfermedad de Chagas. In: CARCAVALLO, R. U.; RABINOVICHh, J. E.; TONN, R. J. **Epidemiologia y Vectores**. Argentina : Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud, 1985. p.55-72.

GAMBOA CUADRADO, J. Ecología de la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) em Venezuela. **Bol. Inf. Dir.Malariol. San. Amb.**, Maracay,Venezuela, v. 14, n. 1-2, p. 3-20, 1974.

GONÇALVES *et al.* **Guia de triatomíneos da Bahia**. Feira de Santana : UEFS, 2012.112 p.

GURGEL-GONÇALVES, R.G. *et al.* Geografic distribution of Chagas disease vectores in Brazil based on ecological niche modeling. **Journal of Tropical Medicine**, [on line], v. 2012, n. 1, p. 1-15, febr. 2012. Disponível em://http:http//www.hindawi.com/journals/jtm/2012/705326/.Acesso em: 22 ago 2016.

GURTLER, R. E *et al.* Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. **Parasitology**, (London), v. 134, n. 1, p. 69-82, jan. 2007.

HAMANO, S. *et al.* Detection of kinetoplast DNA of *Trypanosoma cruzi* from dried feces of triatomine bugs by PCR. **Parasitology Interview**, Amsterdam, v. 50, n....., p. 135-138, july 2001.

HAYES, R. J.; SCHOFIELD, C. J. Estimación de las tasas de incidencia de infecciones crónicas a partir de la prevalencia: la enfermedad de Chagas en América Latina. **Bol of Saint Panam**, Washington, v. 108, p. 308-316, Dic. 1990.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Disponível em:<<https://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=314510>>. Acesso em 02 jun 2015

ILHAK, O. I., ARSLAN, A. Identification of meat species by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. **Turkish Journal of Veterinary Animal**, Ankara, v. 31, p.159–163, june 2007.

KULLBERG, M. *et al.* Housekeeping genes for phylogenetic analysis of eutherian relationships. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 23, n. 8, p. 1493-1503, aug. 2006.

LEE, C. N. *et al.* Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. **Brazilian Journal of Biomedic Scieece**, London, v. 58, n. 2, p. 85–91, 2001.

LENT, H.; WIGODZINSKY, P. Revision of the triatominae (Hemíptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American museum of natural history**. New York, v. 163, n. 3, p.123-520, july 1979.

LOROSA, E. S. *et al.* 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. **Entomologia y Vectores**, Salta, v. 7, n. 2, p.211-225, 2000.

MASSARO, D. C.; REZENDE, D. S.; CAMARGO, L. M. A. Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 228-240, jun. 2008.

MARTINS, J. R.; LEITE, R.; DOYLE, R. Tripanosomatídeos like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 2, p. 113-114, jun. 2008.

MENDES, P. C.; LIMA, S. C. Influência do clima na ocorrência de triatomíneos sinantrópicos no município de Uberlândia-MG. **Caderno Prudentino de Geografia**, Presidente Prudente, v. 2, n. 33, p. 5-20, ago/dez. 2011.

MENDES, R. S. *et al.* Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas canina no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 12, p. 1459-1465, dez. 2013.

MENDONÇA, R. C. *et al.* **Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies**. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: ecologia e flora. 2007, v. 2. Brasília. Embrapa Informação e Tecnologia. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/283269316_Flora_vascular_do_bioma_Cerrado>. Acesso em: 08 jul 2015.

MILES, M.A. Orally acquired Chagas disease: lessons from an urban school outbreak. **Journal of Infectious Diseases**, United States, v. 201, n. 9, p.1282-4, May 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5. ed. rev. ampl. Local : Editora, 1998. Cap. 5.7. ; p. 1-12.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Gontijo, E. D. et al. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.18, n.3, p. 243-254, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. **Vigilância em saúde: zoonoses**. Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

MOTA, J. C. *et al.* Estimativa de taxa de mortalidade e taxa de incidência de sequelas cardíacas e digestivas por doença de Chagas no Brasil, 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 711-720, dez. 2014.

MORETTI, E. *et al.* Doença de Chagas: estudo da transmissão congênita nos casos da infecção materna aguda. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 1, jan/fev. 2005.

NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia Humana**, 12.ed. Rio de Janeiro : Atheneu, 2011.

NÓBREGA, A. A. Oral transmission of Chagas Disease by consumption of açai Palm Fruit, Brasil. **Emerging Inf Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 4, p. 653 – 655, apr. 2009.

OLIVEIRA, J. C. P.; PALMEIRA, P. A.; BARBOSA, V. S. A. Diversidade, prevalência e infecção natural por tripanosomatídeos em triatomíneos (Hemíptera: reduviidae) do Curimataú e Seridó paraibanos. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 2, p. 212-26, abr/jun. 2016.

PAULA, M.B.C. *et al.* Ocorrência e positividade para *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos de municípios da região sudeste do Brasil de 2002 a 2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 1, p. 9-14, jan/fev. 2010.

PAVARINI, S. P. Miocardite chagásica em caninos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1243-1247, jul. 2009.

PERRY, B. D. *et al.* **Investing in animal health research to alleviate poverty**. Nairobi, Quênia; ILRI -International Livestock Research Institute, 2002. 148 p.

PIRON, M. *et al.* Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia. Spain. **Transfusion**, Arlington, v. 48, n. 9, p. 1862-1868, sept. 2008.

PIZARRO, J. C.; LUCERO, D. E., STEVENS, L. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector *Triatoma infestans* high rate found in Chuquisaca, Bolívia. **BMC Infectious Diseases**. [on line], jun. 2007. Disponível em:<[http:// www.ncbi.nih.gov/pmc/articles/PMC1920523/](http://www.ncbi.nih.gov/pmc/articles/PMC1920523/)>. Acesso em: 15 out 2016.

QVARNSTROM, Y. *et al.* Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, United States, v. 6, n. 7, p. 85-91, jul. 2012.

RAMIREZ, L. E. *et al.* Primeira evidências de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 31, n. 1, p. 99-102, jan/fev.1998.

REICHE, E.M.V.; JANKEVICIUS, J.V. Avaliação de métodos alternativos para o diagnóstico laboratorial confirmatório da doença de Chagas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 29, p, 29-40, jan. 1997.

RODRIGUES, V. L. C. C. *et al.* Aspectos relacionados com a infecção por *Trypanosoma cruzi* em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), capturados na região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, p. 156, 2006.

RODRIGUES, A. *et al.* Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection in horses. **Veterinary Parasitology**, New York, v. 46, n. 2, p. 251-158, mar. 2009.

SÁ JUNIOR, A. **Aplicação da classificação de Köppen para o zoneamento climático do Estado de Minas Gerais**. 2009. 101fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Água e Solo) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SALDAÑA, A. *et al.* Risk factors associated with *Trypanosoma cruzi* exposure in domestic dogs from a rural community in Panama. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 2, p. 936-944, nov. 2015.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 9.14-9.23.

SANTANA, V. L. *et al.* Caracterização clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, p. 536-541, jun. 2012.

SILVA, A. S. *et al.*, Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira – SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. 373-376, out. 2007.

SILVA, A. S. *et al.*, Relação parasitemia e leucograma de gatos infectados com *Trypanosoma evansi*. **Semina: Ciência Agrária**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 699-706, jul/set. 2010.

SILVA, M. E. *et al.* Estudo clínico-epidemiológico da doença de Chagas no distrito de Serra Azul, Mateus Leme, centro-oeste do Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 2, p. 178-181, mar/abr. 2010.

SILVA, R. A.; BARBOSA, G. L.; RODRIGUES, V. L. C. C. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas no estado de São Paulo no período de 2010 a 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 259-267, jun. 2014.

SILVA, M. B. A. *et al.* Importância da distribuição geográfica dos vetores da doença de Chagas em Pernambuco, Brasil, em 2012. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 2, p. 195-206, jun. 2015.

SILVEIRA, A.C.; FEITOSA, V.R.; BORGES, R. **Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/83, Brasil**. Brasília : Ministério da saúde, Superintendência de campanhas de saúde pública, 1984.

SILVEIRA, E. A. *et al.* Correlation between infection rate of triatomines and Chagas disease in Southwets of Bahia, Brazil: a warning Sign? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 88, p. 1941-1951, jul. 2016. Suplemento.

SILVEIRA, A.C. *et al.* Avaliação do sistema de vigilância entomológica da doença de Chagas com participação comunitária em Mambai e Buritinópolis, Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n.1, p.39-46, jan/fev. 2009.

SCHMUÑIS, G. A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, A. ; ANDRADE, Z.A; BARRAL- NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. p.1-15.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Doença de Chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 32, p. 16-27, jan/fev. 1990.

SOUZA, A. I. *et al.* Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1351-1356, ago. 2008.

THEKISOE, O. M. M. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 82, n...., p.855–860, May 2010.

VALLEJO GA et al. *Trypanosoma rangeli*: um protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, Colômbia, v. 39, n. 150, p. 111-122, enero-marzo 2015.

VILELA, M. M.; et al. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas em programa de descentralizado: avaliação do conhecimento e práticas de agentes municipais em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n.10, p. 2428-2438, out. 2007.

VINHAES, M. C. et al. Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* using multi-criteria decision analysis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 137, p. 105-110, sept. 2014.

ZELEDÓN, R.; RABINOVICH, J. E. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, Calif, v. 26, p. 101-133, jan. 1981.

ZETUN et al., Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres procedentes de zoológicos do Estado de São Paulo. (SILVEIRA, 2009). **Veterinaria e Zootecnia**, Botucatu, v. 21, n. 1, p. 139-147, mar. 2014.

WIGGLESWORTH, V. B.; GILLET, J. D. The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* and the mechanisms of orientation to the host. **Journal of Experimental Biology**, v. 11, p. 120-139, apr. 1934. Disponível em: <<http://www.jeb.biologists.org/search/>>. Acesso em: 03 mar. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **New global effort to eliminate Chagas disease**. [Resumo na Internet]. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr36/en/index.html>>. Acesso em: 15 jan 2009.

___ **Dourine**, 2009. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/dourine.pdf>.
Acesso em: 20 maio 2015.

**ANEXO A – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E FONTE ALIMENTAR DE
TRIATOMÍNEOS E O PAPEL DO CÃO COMO POSSÍVEL FONTE DE INFECÇÃO
DO *Trypanosoma cruzi***

O projeto em questão visa conhecer as espécies de vetores do *T. cruzi* prevalentes nos municípios que compõem a Superintendência Regional de Saúde de Alfenas e sua fonte alimentar, verificando o envolvimento do cão na manutenção do ciclo vital destes vetores, assim como verificar a infecção desses insetos por tripanosomatídeos e sua distribuição espacial na região em estudo. Para tanto, serão colhidas amostras de sangue venoso de cães, por um médico veterinário, nas localidades com triatomíneos com protozoários flagelados com morfologia semelhante ao *T. cruzi* no conteúdo intestinal dectado no exame parasitológico e positivos para *T. cruzi* pela reação em cadeia da polimerase em tempo real.

A identificação dos animais será feita por meio de códigos e os resultados dos exames será notificado ao proprietário. Os resultados obtidos serão publicados em revistas científicas.

Tendo sido informado pela leitura das instruções acima e ciente de que minha recusa em nada me afetará, declaro meu consentimento para a coleta da amostra sanguínea do (s) cão (es) de minha propriedade.

Nome do proprietário do animal: _____

Nome/idade do animal:

1. _____ Idade: _____

2. _____ Idade: _____

3. _____ Idade: _____

Município: _____

Localidade: _____

Código da localidade: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do proprietário do animal

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

Escopo

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical é um periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, multidisciplinar, com acesso aberto (Licença Creative Commons - CC-BY - <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que publica pesquisas originais relacionadas a doenças tropicais, medicina preventiva, saúde pública, doenças infecciosas e assuntos relacionados. A preferência para publicação será dada a artigos que relatem pesquisas e observações originais. A Revista possui um sistema de revisão por pares, para a aceitação de artigos, e sua periodicidade é bimestral. A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical é publicada em inglês.

Política de avaliação

Os manuscritos submetidos com vistas à publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical são avaliados inicialmente pelos profissionais da secretaria quanto à adequação às normas. Em seguida, são encaminhados para, no mínimo, dois revisores para avaliação e emissão de parecer fundamentado (revisão por pares), os quais, oportunamente, serão utilizados pelos editores para decidir sobre a aceitação, ou não, do mesmo. Em caso de divergência de opinião entre os revisores, o manuscrito será enviado para um terceiro relator para fundamentar a decisão editorial final, de acordo com o workflow do processo de submissão da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (disponível online em <http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/iinstruc.htm#005>).

O contato com o escritório editorial pode ser estabelecido no endereço abaixo:

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Av. Getúlio Gurarritá s/n

Caixa Postal: 118,

CEP: 38001-970

Uberaba, Minas Gerais, Brasil

Tel: 55 34 3318-5287

Fax: 55 34 3318-5279

e-mail: rsbmt@rsbmt.uftm.edu.br

<http://www.scielo.br/rsbmt>

Não há taxa para submissão e avaliação de artigos.

Tipos de manuscrito

A Revista convida à publicação Artigos Originais, Artigos de Revisão e Minirrevisões, Editoriais, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas e Números Especiais.

Artigos Originais: devem relatar pesquisas originais que não tenham sido publicadas ou consideradas para publicação em outros periódicos. O limite de palavras é de 3.500 (excluindo resumo, título e referências). O manuscrito deve conter resumo estruturado com até 250 palavras, com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo Estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito (Introdução, Métodos, Resultados, Discussão), Conflito de Interesses, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas. Um total de cinco ilustrações (tabelas e figuras) é permitido.

Artigos de Revisão: devem ser uma análise crítica de avanços recentes e não apenas revisão da literatura, geralmente a convite do editor. Artigos de Revisão têm o limite de 3.500 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo com até 250 palavras (não estruturado). Cinco ilustrações são permitidas (tabelas e figuras). São publicadas também minirrevisões. Minirrevisões têm no máximo 3.000 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo (não estruturado) com até 200 palavras, três ilustrações (tabelas e figuras) e máximo de 3.000 palavras. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo não estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito, Conflito de Interesses, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas.

Editoriais: usualmente, escritos a convite, considerando os tópicos da área de enfoque da revista, não excedendo a 1.500 palavras, sem resumo e palavras-chaves e no máximo uma figura ou tabela e dez referências.

Comunicações Breves: devem ser relatos sobre novos resultados interessantes dentro da área de abrangência da revista. As comunicações breves devem ter no máximo 2.000 palavras (excluindo resumo, título e referências); Devem conter resumo estruturado com no máximo 100 palavras (com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões) e com até 15 referências. Um máximo de três ilustrações (tabelas e figuras) é permitido. Até três palavras-chaves devem ser fornecidos. O corpo do manuscrito não devem conter subdivisões ou subtópicos. Declaração de conflito de interesses deve ser incluída.

Relatos de Casos: devem ser relatos breves com extensão máxima de 1.500 palavras (excluindo título, resumo e referências), com máximo de três ilustrações (tabelas e figuras), até 12 referências, resumo não estruturado com no máximo 100 palavras e três palavras-chaves. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo, Palavras-Chaves, Texto do Manuscrito (Introdução, Relato de Caso, Discussão), Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas.

Relatórios Técnicos: devem ser precisos e relatar os resultados e recomendações de uma reunião de experts. Será considerado, se formatado como um editorial.

Imagens em Doenças Infecciosas: até três figuras com a melhor qualidade possível. Apenas três autores e três referências são permitidos. O tamanho máximo é de 250 palavras (excluindo título e referências) com ênfase na descrição da figura. Os temas devem envolver alguma lição clínica, contendo título e a descrição das figuras.

Cartas: leitores são encorajados a escrever sobre qualquer tópico relacionado a doenças infecciosas e medicina tropical de acordo com o escopo da Revista. Não devem exceder 1.200 palavras, sem resumo e palavras-chaves, com apenas uma inserção (figura ou tabela) e pode tratar de material anteriormente publicado na revista, com até 12 referências.

Números Especiais: Propostas de números especiais devem ser feitas ao o Editor e/ou Editor Convidado. A proposta será analisada levando em consideração o tema, organização do programa ou produção de acordo com escopo da revista.

Preparação do manuscrito

Autores são aconselhados a ler atentamente estas instruções e segui-las para garantir que o processo de revisão e publicação de seu manuscrito seja tão eficiente e rápido quanto possível. Os editores reservam-se o direito de devolver manuscritos que não estejam em conformidade com estas instruções.

Sistema de Submissão On-line: Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão on-line nos endereços <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo> ou <http://www.scielo.br/rsbmt>. O autor deve escolher dentro do item “Tipos de Manuscrito” uma categoria para o manuscrito: Artigos Originais, Editoriais, Artigos de Revisão, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas, Réplica à Carta ou Outros (quando não se encaixar em nenhuma das categorias listadas). A responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito é inteiramente do autor e seus co-autores.

Carta de Apresentação: a) deve conter uma declaração, assegurando de que se trata de pesquisa original e que, ainda, não foi publicada, nem está sendo considerada por outro periódico científico. Devem constar, também, que os dados/resultados do manuscrito não são plágio. b) deve ser assinada por todos os autores e, na impossibilidade restrita, o autor principal e o último autor podem assinar pelos outros co-autores, mediante procuração. c) Os autores devem incluir na Cover Letter uma declaração de ciência de que o manuscrito, após submetido, não poderá ter a ordem, nem o número de autores alterados, sem justificativa e/ou informação à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. d) Devem declarar que concordam, caso o manuscrito seja aceito para publicação, transferir todos os direitos autorais para a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Contribuição dos autores: Os autores devem incluir, em documento separado, uma declaração de responsabilidade especificando a contribuição, de cada um, no estudo.

Edição da Pré-Submissão: todos os manuscritos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser em inglês. É altamente recomendável que os autores utilizem os serviços de uma empresa profissional de edição e/ou tradução. A revisão/edição da língua inglesa não garante que o manuscrito será aceito para publicação.

Formatação do manuscrito

O manuscrito deve ser preparado usando software padrão de processamento de textos e deve ser impresso (fonte Times New Roman tamanho 12) com espaço duplo em todo o texto, título/legendas para as figuras, e referências, margens com pelos menos 3cm. O manuscrito deve ser dividido nas seguintes seções: Cartão de Apresentação (endereçada ao Editor-Chefe), Página de Título, Título, Resumo, palavras-chaves, Texto do Manuscrito, Agradecimentos, Suporte Financeiro, Declaração de Conflito de Interesses, Lista de

Referências, Título das Figuras/Legendas. A Carta de Apresentação, Página de Título, Agradecimentos e Suporte Financeiro devem ser incluídos em documentos separados (estes dois últimos podem ser incluídos junto com a Página de Título). Abreviações devem ser usadas com moderação.

Página de Título: deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, afiliações institucionais (Departamento, Instituição, Cidade, Estado e País de cada autor). O endereço completo do autor para correspondência deve ser especificado, incluindo telefone, fax e e-mail. Na página de título também podem ser incluídos agradecimentos e suporte financeiro. A quantidade de autores por manuscrito é limitada a oito, exceto para estudos multicêntricos.

Indicação de potenciais revisores: Os autores são convidados a fornecer os nomes e informações de contato (e-mail e telefone) por três potenciais revisores imparciais. Favor informar revisores de região e instituição diferente dos autores.

Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 50 caracteres.

Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

Palavras-chaves: 3 a 6 palavras devem ser listados em Inglês, imediatamente abaixo do resumo estruturado.

Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância.

Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e

uso de animais em laboratório foram seguidas e o número de aprovação deve ser enviado à Revista.

Ensaio Clínico: No caso de Ensaio Clínico, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico (Plataforma REBEC). Estes requisitos estão de acordo com a BIREME/OPAS/OMS e o Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas (<http://www.icmje.org>) e do Workshop ICTPR.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos àqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

Suporte Financeiro: informar todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por “et al”. Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada e no final do manuscrito. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos “em preparação” ou “submetidos para publicação” não devem constar da lista de referência. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados). Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, em ordem numérica crescente, separadas por parênteses, sem vírgula. [Ex.: Mundo(1) (2) (3); Vida(30) (42) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50)]. As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos biomédicos (Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus (Consulte: <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=limits>).

Alguns exemplos de referências:

1. Citação de Artigos em Geral: autores, título do artigo na língua original em que foi publicado, nome do periódico, ano, volume, páginas inicial e final completas.

Russell FD, Coppell AL, Davenport AP. In vitro enzymatic processing of radiolabelled big ET-1 in human kidney as a food ingredient. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:697-701.

2. Capítulo de livro: autores do capítulo, título do capítulo, editores, nome do Livro, edição, cidade, editora, ano e página.

Porter RJ, Meldrum BS. Antiepileptic drugs. In: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology*. 6th ed. Norwalk (CN): Appleton and Lange; 1995. p. 361-380.

3. Livro: autores do livro, nome do livro, edição, cidade, editora e ano.

Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

4. Dissertação/Tese: Autor, Título, Tipo (Dissertação ou Tese), Lugar da Publicação, Nome da Instituição, Ano, Total de páginas.

Cosendey MAE. *Análise da implantação do programa farmácia básica: um estudo multicêntrico em cinco estados do Brasil*. [Doctor's Thesis]. [Rio de Janeiro]: Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz; 2000. 358 p.

Figuras: devem ser submetidas, em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (exemplo: Figura 1; Figura 2). Todas as figuras devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. Título e Legendas: devem ser digitadas com espaçamento duplo no final do manuscrito. Dimensões: As dimensões das figuras não devem ultrapassar o limite de 18cm de largura por 23cm de altura. Veja abaixo a correta configuração para cada formato de figura:

Fotografias: devem ser obrigatoriamente submetidas em alta resolução no formato Tiff. Certifique-se que a mesma foi capturada na resolução mínima de 600 DPI, preferencialmente entre 900-1200dpi, preparadas utilizando programa de Edição de Imagens (Adobe Photoshop, Corel Photo Paint, etc).

Gráficos: criados usando Microsoft Excel, devem ser salvos com a extensão original (.xls).

Mapas e Ilustrações: devem ser vetorizadas (desenhados) profissionalmente utilizando os softwares Corel Draw ou Illustrator em alta resolução.

Imagens: produzidas em software estatístico devem ser convertidas para o formato Excel ou se o programa permitir, em formato PDF.

Ilustrações Coloridas: devem ser aprovadas pelos editores e as despesas extras para confecção de fotolitos coloridos serão de responsabilidade dos autores.

Tabelas: devem ser digitadas com espaçamento simples, com título curto e descritivo (acima da tabela) e submetidas em arquivos separados. Legendas para cada tabela devem aparecer no rodapé da mesma página que a tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo. Tabelas devem ter no máximo 18cm de largura por 23cm de altura, fonte Times New Roman, tamanho 9.

Processo de Envio: os artigos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deverão utilizar apenas a via eletrônica. Todos os manuscritos deverão ser enviados via internet para <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>, seguindo as instruções no topo de cada tela. O processo de revisão pelos pares também será totalmente pela via eletrônica.

Sobre Reenvio e Revisões: a revista diferencia entre: a) manuscritos que foram rejeitados e b) manuscritos que serão re-avaliados após a realização das correções que foram solicitadas aos autores.

Reenvio: caso o autor receba uma carta informando que seu trabalho foi rejeitado e queira que os editores reconsiderem tal decisão, o autor poderá re-enviá-lo. Neste caso será gerado um novo número para o manuscrito.

Revisão: caso seja necessário refazer seu manuscrito com base nas recomendações e sugestões dos revisores, ao devolvê-lo, para uma segunda análise, por favor, encaminhe o manuscrito revisado e informe o mesmo número do manuscrito.

Após a Aceitação: Uma vez aceito para publicação, o processo de publicação inclui os passos abaixo:

a) Formulário de concessão de direitos autorais, fornecido pela secretaria da revista, deve retornar para a revista assinado pelos autores.

b) Provas: serão enviadas ao autor responsável, mencionado no endereço para correspondência, no formato PDF, para que o texto seja cuidadosamente conferido. Nesta etapa do processo de edição, não serão permitidas mudanças na estrutura do manuscrito. Após os autores receberem as provas, deverão devolvê-las corrigidas, dentro de dois a quatro dias.

c) Os artigos aceitos comporão os números impressos obedecendo ao cronograma em que foram submetidos, revisados e aceitos.

d) Os artigos aceitos remanescentes a cada número da revista serão disponibilizados online enquanto aguardam a prioridade para publicação na versão impressa.

Re-impressões: a Revista fornece ao autor, gratuitamente, excertos do artigo em formato PDF, via e-mail.

Custos de Publicação: Não haverá custos de publicação.

A tradução de todo manuscrito deve ser realizada antes da submissão do mesmo. A contratação e o pagamento dos serviços de tradução são de responsabilidade dos autores. A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical não fornece qualquer tipo de serviço de tradução. Custos de publicação de imagens coloridas são de responsabilidade dos autores.

Workflow

Workflow do processo de submissão da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical é um periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical com acesso aberto. É uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relacionadas a doenças tropicais, medicina preventiva, saúde pública, doenças infecciosas e assuntos relacionados. A Revista possui um sistema de revisão por pares para a aceitação de artigos, e sua periodicidade é bimestral. Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão online no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>.

Política de Revisão do Periódico (workflow):

Os manuscritos submetidos para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical são inicialmente avaliados pela Secretaria quanto à adequação do texto às normas do periódico.

Após esta etapa, os manuscritos adequados às Normas Para Publicação da Revista serão avaliados pelo Editor ou Editores Associados quanto ao escopo e a política editorial do periódico. A Secretaria envia o manuscrito para o Editor-Chefe.

O Editor-Chefe designa um Editor Associado ou designa revisores.

O paper será enviado a pelo menos dois revisores num sistema duplo-cego para avaliação e emissão de um relatório fundamentado (peer review), que será usado pelos Editores para decidir se o manuscrito será aceito ou não. No caso de conflito de pareceres dos revisores, o manuscrito será enviado a um terceiro parecerista para validar uma decisão final.

Comentários dos Revisores (Free Form Review) serão encaminhados ao autor correspondente (autor principal para correspondência editorial) para responder aos questionamentos feitos.

Os autores enviam suas respostas aos questionamentos e reenviam a versão revisada do manuscrito. A versão revisada será enviada aos revisores que emitirão um relatório final fundamentado.

Depois da análise final dos revisores, a versão corrigida do manuscrito será enviada aos Revisores de Métodos Quantitativos para análise. Sugestões serão enviadas aos autores para correções e resubmetida aos Revisores de Métodos Quantitativos para reavaliação.

Os apontamentos dos Revisores e as respostas dos autores serão analisados pelos Editores Associados e/ou Editor-Chefe.

O Editor-Chefe emite uma decisão final.

A decisão editorial final (aceitação ou rejeição) é enviada aos autores.

Após esta etapa, inicia-se o processo de edição. O manuscrito aceito é enviado à edição quanto à qualidade linguística do inglês.

A revisão de inglês é enviada aos autores para análise e declaração de aceitação da revisão.

Após esta etapa, inicia-se o processo de diagramação, com contato com o autor correspondente no que diz respeito às figuras, tabelas, fotografias, mapas, ilustrações e formatação em geral.

Após esta etapa, é requerido aos autores declarar formalmente qualquer conflito de interesse, suporte financeiro e cessão de direitos autorais.

Provas são enviadas ao autor correspondente para cuidadosa correção e acuidade tipográfica.

A versão final de cada manuscrito é selecionada para compor o próximo número e será enviada ao Ahead of Print na plataforma SciELO.

A versão impressa é publicada e será disponibilizada em acesso aberto em <http://www.scielo.br/rsbmt>.

ANEXO C – NORMAS DA REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Scope and policy

The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine) is a journal devoted to research on different aspects of tropical infectious diseases. The Journal welcomes original work on all infectious diseases, provided that data and results are directly linked to human health.

The journal publishes, besides original articles, review articles, case reports, brief communications, and letters to the editor. The journal publishes manuscripts only in English.

From 2016 on, the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine) is published on-line only, maintaining the free access.

The manuscripts must be submitted only written in English, so we strongly advise authors with English as a foreign language to have their manuscripts checked by a scientist with English as a first language. Please contact the staff of the Journal at revimtsp@usp.br for suggestions of specialized companies.

The receipt of a manuscript with the English usage considered inappropriate can lead to the return of the paper to the authors even before the beginning of the review process.

In January 2016, the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo established a fee per published article. Beginning on January the 1st, 2016, all the submitted articles will be charged if they are accepted for publication.

These publication fees will supplement public funding from the Universidade de São Paulo and other grants from foundations of the State of São Paulo, as well as from federal supporting agencies. This additional support is essential to ensure quality, the increment of the journal's impact factor and number of citations, the maintenance of the electronic manuscript submission and review system, the review of the English style and of grammar issues.

The fees will be of US\$400 for original articles and reviews; and of US\$250 for case reports, technical reports, brief communications and letters to the editor, provided that the number of pages are in accordance with the type of article. Only for Brazilian citizens the fees will be of BRL 1,500.00 for original articles and reviews; and of BRL 1,000.00 for case

reports, brief communications and letters to the editor. Once the manuscript has been approved, the corresponding author will receive the instructions for the payment of the publication fee. Thereafter, the corresponding author will receive the proof of payment to be able to apply for funding agencies reimbursement.

All types of manuscripts should be sent to the Editor of the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo and they will be peer-reviewed by two or three reviewers of the Editorial Board and/or ad hoc reviewers.

The decision of acceptance for publication lies with the Editors and is mainly based on the recommendations of these reviewers.

A form stating the following items should be sent to the Editorial Office signed by the corresponding author: 1) The manuscript and all parts of it have not been submitted elsewhere; 2) There are no financial or other relationships of any of the authors of the manuscript that might lead to any conflict of interest; 3) The submitted manuscript has been read by all authors carefully. All authors agree that the manuscript represents their work. 4) Describe sources of funding that have supported the work. Please also describe the role of the study sponsor(s), if any, in study design; collection, analysis, and interpretation of data; writing of the paper; and decision to submit it for publication; 5) The corresponding author is indicated below and will be responsible for the communication with the other authors about revisions and final approval of the paper. The manuscripts will be received only by online submission at:<http://mc04.manuscriptcentral.com/rimtsp-scielo>

At the same site the authors can check the status of the submission any time. The electronic file will be used for editorial assessment and online refereeing, and the editorial decisions on the manuscript will be communicated to the corresponding author.

Authors may suggest up to four potential reviewers for their work provided that they give the e-mail address and affiliation of each scientist they have proposed. Please do not suggest scientists of the same affiliations of the authors.

Form and preparation of manuscripts

Original Articles - The text should be preceded by a short summary not exceeding 200 words, and should then proceed to sections of Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. Pages should be numbered consecutively in Arabic numerals. Tables and figures should be referred to in the text. Tables should be numbered and contain a brief specific title. Figures as drawings, photographs,

photomicrographs or electron micrographs, should be planned to suit the size of a single or double page column. Figures should be submitted in TIF format.

Review Articles are intended to investigators who have made substantial contributions to a specific area of transmissible diseases. These manuscripts will be published upon invitation of the editorial board, however their appropriateness will be judged by the editors, and according to editorial criteria, eventually by peer reviewers. A review article should be presented in the same format as a full paper, except that it should not be divided into sections of introduction, material and methods, results and discussion.

Case Reports, Brief Communications and Letters to the Editor are reserved for reporting new observations of critical importance. They should not exceed two or three printed pages, including the illustrations and references.

Acknowledgments:

Should be brief, and should not include thanks to anonymous referees and editors, or effusive comments. Grant or contribution numbers may be acknowledged. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo encourages authors to include a statement to specify the individual contributions of each co-author, which will be published under a separate subheading "Author contributions" following the Acknowledgments

References:

The list of references, including only those actually mentioned in the text or tables, should be in Vancouver format, listed in order of the citation on the text, and numbered consecutively in Arabic numerals. Listing should be as follows:

a) Articles from journals: Last names and initials of all authors (unless there are more than six, when only the first six should be given followed by et al.), full title of the article, title of the journal (title abbreviations by NLM can be found on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), the year of publication, the volume number, the first and last page numbers.

Ex.: Velho PE, Faria AV, Cintra ML, Souza EM, Moraes AM. Larva migrans: a case report and review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:167-71.

Ex.: Costa E, Lopes AA, Sacramento E, Costa YA, Matos ED, Lopes MB, et al. Penicillin at the late stage of leptospirosis: a randomized controlled trial. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:141-5.

b) Books: Last names and initials of all authors, full title of the book, edition, place of publication, the publisher, and the year.

Ex.: Lewin JK. Genes and virus. 2nd ed. Boston: Jones and Bartlett; 2008.

c) Chapter of book: Last names and initials of all authors of the chapter, full title of the chapter, last names and initials of all authors of the book, full title of the book, edition, place of publication, the publisher, the year, the pages of the chapter.

Ex.: Ferreira HO. Doença de Chagas. In: Farhat CF, Carvalho ES, Carvalho LH, Succi RC, editores. Infectologia pediátrica. São Paulo: Atheneu; 1998. p. 531-7.

d) Websites: Name of the organization, full title of the document cited, place of publication (if available), the Publisher (if available), the year (if available), date of citing, URL of the precise document cited (not the organization URL)

Ex.: World Health Organization. Leprosy elimination. Geneva: WHO; 2014 [cited 2014 Dec 15]. Available from: http://www.who.int/lep/situation/new_cases/en/

Ex.: Brasil. Ministério da Saúde. Malária. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. [cited 2015 Nov 05]. Available from: <http://www.saude.gov.br/malaria>

e) Thesis:

The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo will not accept the citation of master of Science, PhD theses, or similar work.

Ethical Guidelines: Papers must state in the Material and Methods section that: 1) informed consent was obtained from all human adult participants and from parents or legal guardians of minors together with the approved consent of the Ethical Commission 2) a consent term was applied to study participants in the case of children over the age of seven and adolescents besides the consent obtained from parents or legal guardians of minors together with the approved consent of the Ethical Commission 3) the maintenance of experimental animals complies with the guidelines of the use of laboratory animals prevailing in the country.

Numbers:

Numbers that begin a sentence or those that are less than 10 should be spelled out using letters. Centuries and decades should be spelled out, e.g. the Eighties or nineteenth century. Laboratory parameters, time, temperature, length, area, mass, and volume should be expressed using digits.

Units:

The International Unit System must be used, with the exception of blood pressure values which are to be reported in mmHg. Please use the metric system for the expression of length, area, mass, and volume. Temperatures are to be given in degrees Celsius.

Devices and equipment:

The Materials and Methods section must include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. The sources of all media (i.e., name and location of manufacturer) or components of a new formulation must be provided.

When centrifugation conditions are mentioned, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: brand of the centrifuge (manufacturer), model of the equipment and model of the rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force (X g rather than revolutions per minute).

For devices and other products, the specific brand or trade name, the manufacturer and their location (city, state, country) should be provided the first time the device or product is mentioned in the text, for example, "IBM SPSS Statistics version 21.0 was used (IBM Corp., Armonk, NY, USA)". Another example: QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Hilden, USA). Thereafter, the generic term (if appropriate) should be used.

Names and identification of drugs and other products:

Authors are asked to use the Recommended International Nonproprietary Name (rINN) for medicinal substances, unless the specific trade name of a drug is actually relevant to the discussion. Generic drug names should appear in lowercase letters in the text. If a specific proprietary drug needs to be identified, the brand name may appear only once in the manuscript in parentheses following the generic name the first time the drug is mentioned in the text.

The description of new methods should be complete and give sources of unusual chemicals, reagents, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, authors are asked to include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, and plasmids, etc.

Patient identification:

The informed consent is not needed if the patient cannot be identified from any material in a manuscript. In the absence of the informed consent, identifying details, such as patient initials, specific dates, specific geographic exposures, or other identifying features (including body features in figures), should be omitted, but this must not alter the scientific meaning.

Important information that is relevant to the scientific meaning should be stated so that the patient cannot be identified, e.g., by stating a season instead of a date, or a region instead of a city.

If a patient can be identified from the material in a manuscript, the informed consent is required. It can be obtained from the patient(s) or their parents/legal guardians in the case of minors.

For children of seven years old or more, beyond the informed consent of the parents/legal guardians, an informed assent of the child should be provided.

The Informed consent requires that the patient has had the opportunity to see and approve the manuscript prior to submission. The written informed consent must state either that the patient has seen and approved the complete manuscript, or that the patient declines to do so.

The patient consent should be attached as an additional file at the time of the manuscript submission. A statement attesting the receipt and archiving of the written consent of the patient should be included in the published article.

Randomized Controlled Trials and Clinical Trials:

The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo supports the policy of Clinical Trials registration delivered by WHO and the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE) recognizing the importance, in open access, of these initiatives for the registration and international knowledge of the information on clinical studies. Therefore, from 2007 on, only papers of clinical research dealing with these issues having an identification number provided by one of the clinical assays validated by established criteria from WHO and ICMJE will be accepted. The addresses can be found in the ICMJE site (<http://www.icmje.org>). The trial registration number should be written at the end of the summary.

Submission of manuscripts

The manuscripts will be received only by on-line submission at: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rimtsp-scielo>, where the authors can check the status of the submission any time. The electronic file will be used for editorial assessment and online refereeing, and the editorial decisions on the manuscript will be communicated to the corresponding author by e-mail.