



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**ESTUDO GENOTÍPICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*: EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ISOLADOS DO HOMEM, TRIATOMÍNEOS E MAMÍFEROS SILVESTRES DO
PARÁ, AMAPÁ E MARANHÃO.**

VERA DA COSTA VALENTE

Belém - Pará
2011

Valente, Vera da Costa

Estudo genotípico de *Trypanosoma cruzi*: epidemiologia e caracterização molecular de isolados do homem, triatomíneos e mamíferos silvestres do Pará, Amapá e Maranhão.

164p. Tese de Doutorado em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários

1. Doença de Chagas 2. *Trypanosoma cruzi* Amazônia Brasileira

VERA DA COSTA VALENTE

ESTUDO GENOTÍPICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*: EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO HOMEM, TRIATOMÍNEOS E MAMÍFEROS SILVESTRES DO PARÁ, AMAPÁ E MARANHÃO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.
Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Gerales Teixeira

Belém - Pará
2011

VERA DA COSTA VALENTE

ESTUDO GENOTÍPICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*: EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO HOMEM, TRIATOMÍNEOS E MAMÍFEROS SILVESTRES DO PARÁ, AMAPÁ E MARANHÃO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Galdes Teixeira

Orientador

Profa. Dra. Marta Maria Galdes Teixeira
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de São Paulo

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ralph Lainson
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas

Profa. Dra. Lourdes Maria Garcêz dos Santos
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas

Profa. Dra. Mônica Cristina Moraes
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas

Prof. Dr. Bento Melo Mascarenhas
Museu Paraense Emílio Goeldi

Profa. Dra. Edilene Oliveira da Silva
Laboratório de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Pará

Belém - Pará
2011

Dedicatória

A meus pais Walmiro e Vitória (*in memoriam*) que nortearam minha vida no caráter e retidão, que me deram a oportunidade de sonhar enfrentando as tempestades de adversidades e sobreviver.

Ao meu esposo Aldo, que me iniciou na pesquisa pelo seu eterno otimismo e me ensinou a andar com prazer por estes confins da Amazônia. A dois anjos que Deus me presenteou: meus filhos Aldo Augusto e Luís Alberto por tanto tempo de renúncia que me obrigou a deixá-los sós.

Epígrafe

“Não corra atrás das borboletas; plante uma flor em seu jardim e todas as borboletas virão até ela”.

Anônimo

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Professora Dra. Marta Maria Galdes Teixeira um farol incandescente nos momentos de escuridão, pelo apego à verdade científica, diligência e paciência. Meu respeito e gratidão.

Ao Instituto Evandro Chagas um ícone da pesquisa biomédica na Amazônia formador de gerações de cientistas regionais e presença importante na minha formação acadêmica.

UFPa/ICB/BAIP cumprindo sua missão de formar pessoal especializado para a Amazônia e com isso diminuir as desigualdades sociais da Região.

À diretora do IEC, Dra. Elisabeth Santos pela visão pragmática e empreendedora. Pela amizade, carinho, pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis e pelo apoio institucional e pessoal incondicionais.

Ao Dr. Sebastião Aldo Valente, Coordenador do Lab-Chagas, lutador e determinado, expôs sem nenhuma reserva a verdadeira face da doença de Chagas na Região, angariou admiração e animosidades e foi o responsável direto pela completa mudança na maneira de se pensar em doença de Chagas na Amazônia. Pelo incentivo, apoio e afeto minha gratidão e respeito.

Ao pessoal técnico e administrativo do Instituto Evandro Chagas, pelo suporte oferecido durante a execução deste trabalho.

Aos amigos pesquisadores incentivadores incondicionais: Drs. Michael Miles, Alexandre Linhares, Jorge Travassos da Rosa, José Maria de Souza, José Augusto Muniz, Habib Fraiha Neto, Antônio Teixeira (UnB), Drs Nilton Andrade e Sônia Andrade (FIOCRUZ-BA) que mantiveram sempre acesa minha esperança e perseverança.

Às amigas Izabel Rodrigues, Lourdes Garcêz, Mônica Moraes, Ocidéa Oliveira, Roseli Braga e Zuíla Corrêa pelas palavras certas nos momentos mais incertos, que me consolaram com cantigas de esperança, que me mostraram as cores quando tudo parecia negro, que fizeram da amizade gotas doce de esperança. Muito obrigado pela dedicação.

À Dra. Ana Yecê profissional médica dedicada e competente que com um trabalho diligente, metucioso e responsável com os pacientes nos forneceu os dados clínicos do Ambulatório de Doença de Chagas/IEC apresentados nesta tese.

Aos Drs. Arlei Marcili e Flávia Maia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo nossos sinceros agradecimentos pela orientação e suporte na caracterização dos isolados de tripanossomatídeos.

Aos Drs. Ângelo Crescente, Nagib Abdon, Raimundo Leão e Lilian Monteiro, pelo apoio na conduta clínica. À Dra. Maria do Carmo Brígido, IBAMA-PA pelo inestimável apoio no licenciamento e

manejo animal. À Dra. Eufrosina Umezawa (IMT/SP) pelos esclarecimentos nos dados sorológicos. À Dra. Silva minha médica e conselheira nos momentos difíceis.

Aos dedicados profissionais técnicos e ex-técnicos do Laboratório de Doença de Chagas/IEC que sempre nos ajudaram com seu labor: Francisco dos Santos Gomes, Raimundo Nivaldo de Almeida, Aguinaldo Freitas, Caroline Miranda, Antonio Silva, Gilberto César, Rosângela Nascimento, Rita Magalhães, Waldemar Duarte, Edinaldo Ribeiro, José Abud de Araújo, José Aprígio Lima, Leonardo Carvalho, Luiz Araújo e Carlos Alberto Oliveira.

Ao Doutor José Macario-Rebelo e ao técnico Gildário Ferreira do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal do Maranhão e FUNASA pelo apoio na pesquisa entomológica na cidade de São Luís.

Aos estagiários e bolsistas: sementes plantadas e espalhadas ao vento para perpetuarem o conhecimento: Leidiane, Deborah, Andréa, Ellen, Sérgio, Fabíola, Caroline, Lívia, Eunice e Rogério.

Ao Laboratório de Geo-Processamento do IEC, em especial ao Dr. Nelson Veiga e Douglas Gasparetto, pelo aconselhamento no geo-referenciamento e confecção de mapas.

Ao colaborador Sandro Magno Pantoja no apoio com o banco de dados, edição de gráficos e figuras.

Ao serviço de Biblioteca do IEC, em especial à Vânia Cunha Araújo, pelo pronto atendimento especialmente aos competentes técnicos Maria José A. Mateus, Isabella M. A. Mateus, Sheila de M. Lobo, Maria Izaeth B. do Carmo e Nilton M. Pereira, pelo apoio técnico no levantamento e obtenção dos artigos e auxílio na editoração desta tese.

À Profa. Ivete Noronha Tavares pela revisão gramatical do Manuscrito e ao pessoal do Setor de Informática do IEC, pelo apoio sempre disponível.

A todos os colegas da SEPAR que acreditaram na minha capacidade e competência.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação do BAIP, Dra. Jeannie, secretaria e demais funcionários, por todos os serviços e orientação prestados no decorrer deste trabalho.

A todos os professores do BAIP por compartilharem dos ensinamentos preciosos.

Às Secretarias Municipais de Saúde de Barcarena, Belém, Cachoeira do Arari, (PA), São Luis, (MA) e Santana pelo apoio logístico neste trabalho tão extenso. Especialmente ao Dr. Clóvis Miranda, da Secretaria Estadual de Saúde do Amapá, pelo inestimável apoio. A todos nossos pacientes que permitiram acompanhamento laboratorial e com que fizemos sincera amizade. Aos agentes comunitários das mesmas localidades, especialmente à Sra. Leni Silva, presidente da Associação de Senhoras do Igarapé da Fortaleza, voluntária em todas as visitas aos pacientes.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. A INFECÇÃO CHAGÁSICA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA	17
1.2. ECOEPIDEMIOLOGIA DE VETORES E RESERVATÓRIOS DE <i>T. CRUZI</i> NA AMAZÔNIA	23
1.2.1. Vetores	23
1.2.2. Reservatórios, ciclos e vias de transmissão de <i>T. cruzi</i> na Amazonia	29
1.2.2.1 Transmissão vetorial	30
1.2.2.2 Transmissão oral	31
1.3. SURTOS DE DOENÇA DE CHAGAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA	34
1.4. DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>T. CRUZI</i>	41
1.4.1. Linhagens de <i>T. cruzi</i> e associação com formas clínicas da doença de Chagas na Amazônia	45
2. JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVOS	49
3.1. OBJETIVO GERAL	49
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1. DESCRIÇÃO DOS MUNICÍPIOS OU LOCALIDADES E DURAÇÃO DOS ESTUDOS	50
4.1.1. Município de Barcarena – Pará	50
4.1.1.1. Localização, população e economia	50
4.1.1.2. Clima, vegetação e hidrologia	50
4.1.1.3. Fauna de mamíferos e de triatomíneos descritas	51
4.1.2. Município de Belém – Pará	51
4.1.2.1. Localização, população e economia	51
4.1.2.2. Clima, vegetação, hidrologia e fauna	54
4.1.3. Município de Cachoeira do Arari – Pará	55
4.1.3.1. Localização, população e economia	55
4.1.3.2. Clima, vegetação, hidrologia e fauna	55
4.1.4. Município de Santana – Amapá	56
4.1.4.1. Localização, população e economia	56
4.1.4.2. Clima, vegetação, hidrologia e fauna	56
4.1.5. Município de São Luís – Maranhão	57

4.1.5.1. Localização, população, saúde e histórico	57
4.1.5.2. Clima, vegetação, hidrologia e fauna	57
4.2. APRESENTAÇÃO DOS SURTOS DE DOENÇA DE CHAGAS NOS ESTADOS DO PARÁ E AMAPÁ SELECIONADOS E DOS ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS NO ESTADO DO MARANHÃO	59
4.2.1. Surto de Barcarena	59
4.2.2. Surto de Belém	60
4.2.3. Surto de Cachoeira de Arari	61
4.2.4. Surto de Santana, (AP)	61
4.2.5. Visitas às áreas de estudo	62
4.3. ESTUDO DOS TRIATOMÍNEOS	62
4.3.1. Coleta de triatomíneos em domicílios e anexos por busca ativa	62
4.3.2. Coleta de triatomíneos silvestres	62
4.3.2.1. Em palmeiras	62
4.3.2.2. Com armadilha de luz	63
4.4. ESTUDOS DE ANIMAIS SILVESTRES	64
4.5. ESTUDOS DA POPULAÇÃO HUMANA	65
4.5.1. Identificação de casos agudos de doença de Chagas e tratamento dos pacientes	65
4.5.2. Coleta de material	66
4.5.3. Exames parasitológicos	66
4.5.3.1. Pesquisa de <i>T. cruzi</i> em gota espessa e pelo método de concentração <i>QBC® System Quantitative Buffy Coat</i>	66
4.5.3.2. Hemocultura e xenodiagnóstico artificial	66
4.5.4. Definição de amostragem e pesquisa sorológica	67
4.6. IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE TRIPANOSSOMAS	68
4.6.1. Triatomíneos	68
4.6.2. Mamíferos e humanos	68
4.7. CRIOPRESERVAÇÃO DE <i>TRIPANOSSOMA sp.</i>	68
4.8. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE TRIPANOSSOMAS	69
4.8.1. Cultura e preparação de massa celular de <i>Trypanosoma sp.</i>	69
4.8.2. Extração de DNA genômico	69
4.8.3. Identificação e genotipagem dos isolados de <i>Trypanosoma sp.</i>	69
5. RESULTADOS	71

5.1. SURTOS E CASOS DE DCA IDENTIFICADOS E ESTUDADOS	71
5.1.1. Surto de Barcarena	71
5.1.2. Surto de Belém	75
5.1.3. Surto de Cachoeira do Arari	77
5.1.4. Surto de Santana, (AP)	79
5.2. PESQUISA PARASITOLÓGICA DE <i>T. CRUZI</i> NOS PACIENTES, PARENTES, VIZINHOS E CONTATOS ASSOCIADOS AOS SURTOS	82
5.3. ESTUDO SOROLÓGICO DAS POPULAÇÕES ASSOCIADAS AOS SURTOS	83
5.4. ESTUDO DE RESERVATÓRIOS	84
5.4.1. Captura e identificação de mamíferos	84
5.4.2. Exames parasitológicos	84
5.5. LEVANTAMENTO DE TRIATOMÍNEOS NOS LOCAIS DOS SURTOS	86
5.5.1. Estudo com triatomíneos em palmeiras, armadilhas de luz e outros ecótopos	86
5.5.1.1. Triatomíneos coletados em palmeiras	86
5.5.1.2. Triatomíneos capturados em armadilhas de luz	87
5.6. PESQUISA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM TRIATOMÍNEOS	87
5.7. ISOLAMENTO EM CULTURA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS DOS CASOS HUMANOS, DE ANIMAIS E DE TRIATOMÍNEOS	88
5.8. GENOTÍPAGEM DOS ISOLADOS DE <i>T. CRUZI</i>	88
6. DISCUSSÃO	93
6.1. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, SINTOMATOLOGIA E DADOS GERAIS DOS SURTOS ESTUDADOS	94
6.2. ESTUDOS SOROLÓGICOS REALIZADOS	97
6.3. ESTUDOS DE RESERVATÓRIOS	98
6.4. ESTUDOS DE TRIATOMÍNEOS	101
6.5. ISOLAMENTO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE TRIPANOSSOMAS	103
7. CONCLUSÕES	111
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
9. ANEXOS	145

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição dos casos de doença de Chagas por UF e proporção de casos associados ou não à transmissão pela via oral.	22
Figura 2. Distribuição dos surtos de doença de Chagas no Brasil, 1965 a 2011.	23
Figura 3. Série histórica da DCA na Amazônia Brasileira, 1968 a 2011.	35
Figura 4. Distribuição da doença de Chagas aguda nos Estados do Pará, Amapá, Amazonas e Acre, 1968 – 2011.	39
Figura 5. Diagrama representativo da unidade repetitiva do gene de mini-exon ou Spliced Leader.	42
Figura 6. Municípios de Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari, Estado do Pará e Santana, Estado do Amapá onde foram realizados os estudos.	52
Figura 7. Bairros do Município de São Luís para estudo do ciclo de <i>T. cruzi</i> .	53
Figura 8. Triatomíneos capturados em palmeira e em armadilhas de luz.	63
Figura 9. Armadilha de arame e captura de mamíferos silvestres.	64
Figura 10. Mamífero silvestre capturados em trabalhos de campos.	65
Figura 11. Conversa com as comunidades sobre os objetivos do trabalho.	65
Figura 12. Marcador molecular com 50 pb. Genotipagem pelo gene de mini-exon de isolados de humanos.	89
Figura 13. Marker com 50 pb. Genotipagem pelo gene de mini-exon de isolados de mamíferos silvestres, domésticos e triatomíneos silvestres e domésticos.	89

Lista de tabelas e quadros

Tabela 1. Surto de doença de Chagas fora da Amazônia Brasileira, 1967-2008.	34
Tabela 2. Surto de doença de Chagas na Amazônia Brasileira de 1968 a 2009.	37
Tabela 3. Estudo sorológico para doença de Chagas nos municípios de Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari (PA), Santana (AP) e São Luís (MA) entre os anos de 2004 e 2007.	67
Tabela 4. Distribuição de casos de DCA por sexo no surto de Vila do Conde, Barcarena, PA – 2006.	71
Tabela 5. Distribuição de casos de DCA por faixa etária surto de Vila do Conde Barcarena, PA – 2006.	73
Tabela 6. Distribuição dos casos de acordo com os dias e meses no surto de DCA em Vila do Conde, Barcarena, PA – 2006.	73
Tabela 7. Frequência dos sinais e sintomas observados no surto de Vila do Conde, Barcarena, PA – 2006.	74
Tabela 8. Resultados exames laboratoriais observados no surto de DCA em Vila do Conde, Barcarena, PA – 2006.	74
Tabela 9. Distribuição de casos de DCA por sexo surto de Belém, PA – 2003	75
Tabela 10. Distribuição de casos de DCA por faixa etária surto de Belém, PA – 2003.	75
Tabela 11. Distribuição dos casos de acordo com os dias e meses no surto de DCA em Belém, PA – 2003.	75
Tabela 12. Frequência dos sinais e sintomas observados no surto de Belém, PA – 2003.	76
Tabela 13. Resultados exames laboratoriais observados no surto de DCA em Belém, PA – 2003.	77
Tabela 14. Distribuição de casos de DCA por sexo surto de Cachoeira do Arari, PA – 2006.	77
Tabela 15. Distribuição de casos de DCA por faixa etária surto Cachoeira do Arari, PA – 2006.	77
Tabela 16. Distribuição dos casos de acordo com os dias e meses no surto de DCA em Cachoeira do Arari, PA – 2006.	78
Tabela 17. Frequência dos sinais e sintomas observados no surto de Cachoeira do Arari, PA – 2006.	78
Tabela 18. Resultados exames laboratoriais observados no surto de DCA em Cachoeira do Arari, PA – 2006.	79
Tabela 19. Distribuição de casos de DCA por sexo no surto de Igarapé da Fortaleza, Santana, AP – 2004.	79
Tabela 20. Distribuição de casos de DCA por faixa etária no surto de Igarapé da Fortaleza, Santana, AP – 2004.	80

Tabela 21. Distribuição dos casos de acordo com os dias e meses no surto de Igarapé do Fortaleza, Santana, AP – 2004.	80
Tabela 22. Frequência dos sinais e sintomas observados no surto de Igarapé do Fortaleza, Santana, AP – 2004.	81
Tabela 23. Resultados exames laboratoriais observados no surto de DCA em Igarapé do Fortaleza, Santana, AP – 2004.	82
Tabela 24. Porcentual de positividade de testes parasitológicos aplicados ao diagnóstico de 63 pacientes com DCA em Belém, Barcarena e Cachoeira do Arari (PA) e em Santana (AP) – 2003 – 2007.	82
Tabela 25. Pesquisa parasitológica em Surtos de doença de Chagas em comunidades dos municípios de Barcarena, Cachoeira do Arari (PA) e Santana (AP) com ocorrência de surtos de DCA, 2004 – 2007.	83
Tabela 26. Pesquisa sorológica para anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> em comunidades dos municípios de Barcarena, Cachoeira do Arari e Santana com ocorrência de surtos de DCA, 2004 – 2007.	83
Tabela 27. Mamíferos capturados e taxa de infecção para tripanossomas nos municípios de Barcarena e C. do Arari (PA), Santana (AP) e São Luís (MA), 2004 – 2007.	84
Tabela 28. Presença de tripanossomas em mamíferos silvestres coletados nos municípios de Barcarena e C. do Arari (PA), Santana (AP) e São Luís (MA), 2004 – 2007.	85
Tabela 29. Palmeiras regionais examinadas com presença de triatomíneos nos municípios de Barcarena, Cachoeira do Arari (PA), Santana (AP) e São Luís (MA) período de 2004 a 2007.	86
Tabela 30. Triatomíneos capturados com armadilha de luz e taxa de infecção para <i>T. cruzi</i> nos municípios de Barcarena e C. do Arari (PA) e Santana (AP) entre 2004 e 2007.	87
Tabela 31. Isolados de tripanossomatídeos obtidos durante os estudos em Barcarena e Cachoeira do arari (Pará), Santana (Amapá) e São Luís (Maranhão) 2004 – 2007.	88
Quadro 1. Municípios dos Estados do Pará, Amapá e Amazonas com registro de casos de doença de Chagas aguda, 1968 - 2011.	40
Quadro 2. Informações clínico-epidemiológicas dos surtos de DCA estudados em municípios do Pará e Amapá.	72
Quadro 3. Isolamento e caracterização de tripanossomatídeos pelo gene de mini-exon obtidos nos estudos em Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari (pará), Santana (Amapá) e São Luís (Maranhão) 2004 – 2007	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SÍMBOLOS

°C	Graus centígrados
μ	Micron
μl	Microlitro
μM	Micromolar
ABA	Abaetetuba
ALAT	Alanina-aminotransferase
ANA	Ananindeua
Ar	Armadilha
ASAT	Aspartato-aminotransferase
BAR	Barcarena
BEL	Belém
bp	Pares de bases
BRA	Bragança
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i>
Cap/Exa	Capturado/ Examinado
CL	Clone
cm	Centímetros
DCA	Doença de Chagas Aguda
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxidonucleotídeo
EDTA	Etileno-diamino tetra-acetato de sódio
ELISA	Ensaio imonuenzimático
G6PD	Glicose-6-fosfato-dehidrogenase
GE	Gota espessa
GPI	Glicose-fosfato-isomerase
HAI	Hemaglutinação indireta
Hemo	Hemocultura
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hoff	Meio de cultura desenvolvida por Hoff

IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
KDNA	Ácido desoxirribonucléico da mitocôndria
Kg	Kilograma
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
m RNA	RNA mensageiro
MDH	Malato desidrogenase
ME	Microepidemia
Mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
NEG	Negativo
ng	Nanogramas
NR	Não realizado
NREA	Não reagente
Palm	Palmeira
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGM	Phosphofoglucomutase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol

Pop	População
POS	Positivo
QBC	<i>System Quantitative Buffy-Coat</i>
r DNA	DNA ribossômico
r RNA	RNA ribossômico
RAPD	Amplificação Randômica de DNA Polimórfico
Rnas	Molécula de RNA dotada de função enzimática
RPM	Rotação por Minuto
RPMI 1640	Meio monofásico de cultura desenvolvido pela Roswell Park Memorial Institute
SL	<i>Spliced leader</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TBE	Tampão Tris-Borato EDTA
TCI	<i>Trypanosoma cruzi</i> I
TCII	<i>Trypanosoma cruzi</i> II
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFD	Tratamento fora do domicílio
TR	<i>Trypanosoma rangeli</i>
Tris KCL	Tris(Hidroximetil) aminometano
Tris-HCL	Tris-Hidroximetil ácido clorídrico
UV	Ultra violeta
VE	Vigilância Epidemiológica
W	Watts
Xeno	Xenodiagnóstico
Z1	Zimodema 1
Z2	Zimodema 2
Z3	Zimodema 3

Resumo

A doença de Chagas aguda (DCA) é endêmica na Amazônia Brasileira sendo a via oral a principal forma de transmissão com surtos familiares ou multifamiliares. Esta via independe da colonização de triatomíneos no domicílio e a ocorrência é regular com média de 100 casos/ano e 5% de óbitos. Apresenta distribuição espaço-temporal bem definida, colocando a enfermidade como emergência de importância em saúde pública nos estados do Pará, Amapá e Amazonas. A presença de mamíferos e triatomíneos silvestres, infectados naturalmente com o *Trypanosoma cruzi* e habitando distintos ecótopos terrestres e arbóreos, mantém um intenso ciclo enzoótico em toda a Amazônia. Perfis moleculares de linhagens de *T. cruzi* na região estão associados a hospedeiros mamíferos (incluindo o homem), triatomíneos, ecótopos e manifestações clínicas. Foram estudados quatro surtos de DCA ocorridos nos Municípios de Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari no Estado do Pará e em Santana, no Estado do Amapá e abordados os aspectos epidemiológicos (parasitológico e sorológico manifestações clínicas, reservatórios e triatomíneos silvestres associados aos surtos). Foi investigado também em São Luís, Estado do Maranhão, o ciclo domiciliar e silvestre do *T. cruzi*, porém sem a ocorrência de casos de DCA. O estudo incluiu também a genotipagem molecular de *T. cruzi* pelo gene de mini-exon dos isolados (homem, mamíferos e triatomíneos silvestres) associados aos diferentes ciclos de transmissão. O diagnóstico parasitológico foi confirmado em 63 pacientes com a seguinte sensibilidade nos testes aplicados: 41,3% (26/63) pela gota espessa; 58,7% (37/63) no QBC[®]; 79,4% (50/63) no xenodiagnóstico e 61,9% (39/63) na hemocultura. A sorologia de 2648 pessoas por hemaglutinação indireta (HAI) foi de 3,05% (81/2648) e imunofluorescência indireta IFI apresentaram respectivamente resultados de e 2,49% (66/2648) para IgG e 2,37 (63/2648) para IgM. Os resultados em São Luís foram todos negativos. Foram capturados 24 mamíferos, 13 *Didelphis marsupialis*, 1 *Marmosa cinerea*, 5 *Philander opossum*, 3 *Metachirus nudicaudatus*, 1 *Oryzomys macconnelli*, 1 *Oecomys bicolor* e 433 *R. rattus*. A taxa de infecção para *T. cruzi* foi de 7,14% (29/404). Um total de 3279 triatomíneos foi capturado sendo: *Triatoma rubrofasciata* ($n=3008$), com taxa de infecção (TI) de 30,46%, (39/128), *Rhodnius robustus* ($n=137$), com TI de 76% (79/104), *R. pictipes* ($n=94$), TI de 56,9% (49/86%), *E. mucronatus* ($n=6$) e *P. geniculatus* ($n=12$) com TI de 50% e as demais espécies sem infecção *R. neglectus* ($n=5$) e *P. lignarius* ($n=6$). As palmeiras foram os principais ecótopos dos triatomíneos silvestres. O urucurizeiro (*S. martiana*) apresentava infestação de 47,41% (101/213) dos triatomíneos; o “inajazeiro” (*Maximiliana regia*) 35,21% (75/213); o “babaqueiro” (*Orbignya speciosa*) 5,16% (11/213); o “dendezeiro” (*Eleas melanococca*) 1,87% (4/213) e a “bacabeira” (*Oenocarpus bacaba*) 10,32% (22/213). Para a genotipagem foram obtidos 46 isolados de tripanossomas de origem humana, 31 isolamentos de mamíferos silvestres e 74 amostras de triatomíneos. Todos os isolados foram caracterizados como da linhagem TcI de *T. cruzi*. Todos os casos humanos no Pará foram caracterizados como positivos por exame parasitológico. Nem todos os casos de Santana, Amapá, apresentaram casos parasitológicos positivos, pela demora do diagnóstico, mesmo assim estes foram definidos como DCA. Exames como xenodiagnóstico, hemocultura e o QBC[®] foram mais sensíveis do que a gota espessa. A sorologia por HAI e IFI (IgG e IgM) tiveram excelente sensibilidade para detectar os casos agudos em tempos distintos de infecção. O achado de mamíferos (*D. marsupialis*) e triatomíneos silvestres (*R. pictipes* e *P. geniculatus*) infectados com consideráveis taxas de infecção para *T. cruzi* no entorno das residências dos pacientes sustentam a importância destes hospedeiros associados à transmissão da DCA. Apesar de na Amazônia circularem vários genótipos de *T. cruzi* nos diferentes hospedeiros, neste trabalho foi identificada somente a linhagem TcI de *T. cruzi*, a mais predominante na Região. Em São Luís, Maranhão, embora sem registro de casos de DCA apresenta um ciclo domiciliar associados ao rato doméstico e o triatomíneo da espécie *T. rubrofasciata*, e um ciclo silvestre mantido por didelfídeos. Nos dois ciclos circulam a linhagem TcI de *T. cruzi*. Estudos com marcadores de maior resolução com isolados de *T. cruzi* regionais podem ajudar a esclarecer os ciclos de transmissão, as rotas de contaminação e os hospedeiros envolvidos em casos de DCA na Amazônia.

Abstract

The acute Chagas disease (ACD) is endemic in the Brazilian Amazon, and its main transmission route is oral, throughout family and multi-family outbreaks. This route is independent from the colonization of triatomine bugs in dwellings and its occurrence is regular, with mean rates of 100 cases per year and a lethality rate of 5%. The disease has a well-defined spatio-temporal distribution, which makes it a relevant public health concern in the states of Pará, Amapá and Amazonas. The existence of wild mammals and triatomine bugs naturally infected with *Trypanosoma cruzi* inhabiting different terrestrial and arboreal ecotopes maintains an intense enzootic cycle all over the Amazon region. Molecular profiles of *T. cruzi* lineages in the region are associated with mammal reservoirs (including humans), triatomine bugs, ecotopes and clinical manifestations. We analyzed four ACD outbreaks in the municipalities of Barcarena, Belém and Cachoeira do Arari on Pará State, and Santana on Amapá State, based on epidemiologic features (laboratory, parasitological and serological diagnoses, clinical manifestations and the reservoirs and wild triatomines related to the outbreaks). We also investigated the domestic and wild transmission cycles of *T. cruzi* in São Luis on Maranhão State, without the occurrence of ACD cases. This study comprised molecular genotyping of *T. cruzi* on the mini-exon gene of the isolates associated with both transmission cycles (humans, mammals and wild triatomine vectors). Parasitological diagnosis was confirmed in 63 patients with the following sensitivity rates: 41.3% (26/63) for the thick blood film method; 58.7% (37/63) for QBC[®]; 79.4% (50/63) for xenodiagnosis; and 61.9% (39/63) for blood culture. The serological diagnosis of 2648 individuals by indirect hemagglutination assay (IHA) was of 3.05% (81/2648), whereas the results of the indirect immunofluorescence test (IIF) were 2.49% (66/2648) for IgG and 2.37% (63/2648) for IgM. All tests carried out in São Luís were negative. A total of 24 mammals, 13 *Didelphis marsupialis*, 1 *Marmosa cinerea*, 5 *Philander opossum*, 3 *Metachirus nudicaudatus*, 1 *Oryzomys macconnelli*, 1 *Oecomys bicolor* and 433 *R. rattus* were captured. The infection rate for *T. cruzi* was of 7.14% (29/404). A total of 3279 triatomine bugs were captured: *T. rubrofasciata* ($n=3008$) and infection rate (IR) of 30.46%, (39/128) and *R. robustus* ($n=137$) IR of 76% (79/104), *R. pictipes* ($n=94$), IR of 56.9% (49/86%) *E. mucronatus* ($n=6$) and *P. geniculatus* ($n=12$) IR of 50% and the other non-infected species *R. neglectus* ($n=5$) and *P. lignarius* ($n=6$). Palm trees were the main ecotopes for the wild triatomine bugs. *S. martiana* was infested with 47.41% (101/213) of the triatomines; *Maximiliana regia*, 35.21% (75/213); *Orbignya speciosa*, 5.16% (11/213); *Eleas melanococca*, 1.87% (4/213); and *Oenocarpus bacaba*, 10.32% (22/213). Genotyping was carried out using 46 isolates of trypanosomes obtained from humans, 31 from wild mammals and 74 from samples of triatomine bugs. All isolates were characterized as belonging to the Tc1 lineage. All human cases in Pará were characterized as positive by parasitological testing. Not all the cases in Santana were tested positive because of the delay on diagnosis, but they were defined as positive. Xenodiagnosis, blood culture and QBC[®] were more sensitive than the thick blood film. Serological examinations by IHA and IIF (IgG and IgM) presented an optimal sensitivity to detect acute cases in different moments of infection. Mammals (*D. marsupialis*) and wild triatomine bugs (*R. pictipes* and *P. geniculatus*) infected with high infection rates of *T. cruzi* in the patients' peridomicile area account for the importance of these reservoirs in the transmission cycle of the ACD, and are associated with its transmission. Even though several genotypes of *T. cruzi* circulate in the Amazon Region, only the Tc1 lineage was identified in the patients, mammals and triatomines investigated in this study. In São Luís, in spite of these having no record of human cases of ACD, it has a domestic cycle associated with the black rat and the triatomine bugs of the species *T. rubrofasciata*, as well as a sylvatic cycle associated with didelphids. The Tc1 cycles circulate in both cycles. Studies with isolates of local *T. cruzi* using markers with a higher definition might help clarify the transmission cycles, transmission routes and the reservoirs involved in cases of ACD in the Amazon Region.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A INFECÇÃO CHAGÁSICA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Carlos Chagas descreveu em 1909, a enfermidade que mais tarde se tornaria um dos mais sérios agravos à saúde pública nas Américas. Estimava-se que até 1991, data que antecedeu às campanhas dos países do Cone Sul para controle do *Triatoma infestans*, existiam mais de 16 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* do México à Argentina, incluindo todos os países da América Central, com diferentes prevalências (UNDP/WORLD BANK/OMS, 1990). O Brasil detinha até o início dos anos 90, 40% dos casos de doença de Chagas: e a área endêmica brasileira, com presença de vetores epidemiologicamente importantes, estendia-se por mais de 2 milhões de km² (Schofield, 1994). Posteriormente, com as iniciativas para o controle de triatomíneos domiciliares implementadas pelos países do Cone Sul da América do Sul, países andinos e da América Central, obteve-se uma redução substancial da transmissão vetorial, apesar de prevalências e incidências ainda altas em alguns países. Atualmente, o número de infectados é estimado em cerca de 9 milhões de pessoas (Dias *et al.* 2002ab, 2008), Dias, 2006a; WHO, 2002; Moncayo, 1997, 2003; Schofield *et al.*, 2006; Coura, 2007; Moncayo & Silveira, 2009).

A dispersão da doença de Chagas no Brasil guarda relação direta com a presença das principais espécies de triatomíneos domiciliares: *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Triatoma sordida* (Stal, 1859), *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911), *Triatoma pseudomaculata* (Correa & Espinola, 1964) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835). Esses vetores estão distribuídos em ambientes naturais predominantes nas regiões úmidas da Mata Atlântica e regiões semiáridas do Cerrado e da Caatinga. Regiões semiáridas vêm crescendo de maneira exponencial, devido à destruição das matas primárias e secundárias em áreas da Mata Atlântica (Forattini, 1980; Malcolm, 1991; Silveira, 2000; Silveira *et al.*, 2002; Alves, 2007; Brasileiro, 2009).

Os principais elementos históricos que podem justificar a domiciliação dos triatomíneos apontam para o esgotamento de sistemas ecológicos e perda de fertilidade do solo, que somados aos críticos padrões sociais, educacionais, habitacionais e nutricionais que caracterizam as condições de grande parte da população rural brasileira, contribuíram diretamente para a introdução e permanência da doença de Chagas, resultando em grandes áreas endêmicas. A Amazônia Brasileira, considerada até o momento a última fronteira para o processo de endemização da doença, já apresenta em algumas regiões a maior parte das características envolvidas nesse processo. Como o desmatamento é seguido de drástica redução da reserva de aves e mamíferos, fonte alimentar de primeira ordem para os insetos hematófagos, pode facilitar a domiciliação dos triatomíneos (Monteiro, 2000).

Um fator adicional da Região Amazônica, que pode facilitar o estabelecimento dessa endemia, é a ampla distribuição das espécies de triatomíneos da tribo Rhodniini, a mais importante na Região, e de espécies do gênero *Panstrongylus*. Esses triatomíneos têm sido encontrados em áreas de ocupação da Amazônia associados com diversas espécies de mamíferos terrestres e arborícolas em diferentes ecótopos e nichos ecológicos. Algumas espécies já têm sido apontadas como de potencial importância na transmissão de *T. cruzi* do ambiente silvestre para o ambiente doméstico. *Panstrongylus geniculatus* foi encontrado em áreas ribeirinhas da Região do Marajó no Pará associados com porcos domésticos (Valente V. *et al.*, 1998). *Triatoma maculata*, apesar de habitar preferencialmente ninhos de aves, portanto raramente encontrada infectada com *T. cruzi*, tem sido reporado em nichos peridomésticos (Luitgards-Moura *et al.*, 2005; Abad-Franch & Monteiro, 2007).

A exploração da Região Amazônica, desde as culturas de subsistência com abertura de pequenos, porém numerosos, pastos e roças, até a exploração em larga escala para extração de madeira e agro-negócio, têm promovido o desmatamento das coberturas vegetais originais e o avanço do homem sobre o habitat natural (Brasil, 2007). Esta prática propicia o aparecimento de espaços abertos, contribuindo para o desaparecimento progressivo dos animais silvestres, o que pode levar à adaptação das espécies nativas de triatomíneos ao ambiente humano e a permitir a sobrevivência de espécies importadas de regiões com ecótopos semelhantes (Shaw *et al.*, 1969; Forattini, 1980; Malcolm, 1991; Teixeira *et al.*, 2001).

O controle da doença de Chagas na Amazônia torna indispensável um abrangente sistema de vigilância que permita a detecção rápida de casos agudos e de qualquer indício de domiciliação de triatomíneos endêmicos na Região. As possibilidades de sucesso do processo de colonização desses triatomíneos são ainda pouco conhecidas e demandam estudos taxonômicos e comportamentais das diferentes espécies de triatomíneos a fim de investigar quais espécies teriam maior potencial de se estabelecer nos ambientes peridoméstico e doméstico. Esses estudos poderão aferir os fatores de riscos para as diferentes espécies, prováveis mecanismos de adaptação e preferência por ecótopos e animais que podem servir como fonte de alimentação. Esse conhecimento é fundamental para que medidas de controle eficientes possam ser implementadas antes que o processo de domiciliação de alguma espécie ocorra na Amazônia (Noireau *et al.*, 2000; Abad-Franch *et al.*, 2009; Valente S. *et al.*, 2009).

Os primeiros registros de infecção pelo *T. cruzi* na Amazônia Brasileira são de Carlos Chagas, que descreveu a infecção em macacos *Saimiri sciureus* capturados no Estado do Pará (Chagas, 1924a; 1924b). Mais tarde, Ferreira & Deane (1938a) e Deane & Jansen (1939) não está citado na bibliografia identificaram um protozoário indistinguível de *T. cruzi* em diversos mamíferos silvestres e triatomíneos. Rodrigues & Melo (1942) realizariam o primeiro inquérito hemo-parasitológico no bairro

do Aurá, periferia de Belém, com resultados negativos para os 117 indivíduos examinados. Porém, esse estudo detectou infecção por *T. cruzi* em um cão doméstico, além de tamanduás, gambás, tatús, iraras e morcegos. Em diversos estudos, Deane & Demasceno (1961b) e Deane L (1961a; 1964a; 1964b; 1967) encontraram tripanossomas morfologicamente semelhantes a *T. cruzi* em marsupiais e morcegos capturados próximos de Belém e na rodovia Belém-Brasília. Lainson *et al.* (1979) encontraram diversos animais infectados por *T. cruzi* quando examinaram 1.171 mamíferos de 13 espécies no Pará, com as maiores prevalências nos marsupiais (Didelphidae), porco-espinho (*Coendou sp.*) e outros roedores, tatús (*Dasyopus novencinctus*) e quatis (*Nasua nasua*).

No final dos anos setenta Miles *et al.* (1981a; 1981b), Póvoa *et al.* (1984) com estudos utilizando marcadores bioquímicos identificaram três perfis distintos de *T. cruzi*, denominados zimodemas (Z1, Z2 e Z3) que estavam associados com reservatórios, ecótopos e triatomíneos. Assim, o Z1 fora relacionado com didelfídeos de habitats arbóreos e triatomíneos do gênero *Rhodnius* e o zimodema 3 associado com tatus em ambientes terrestres e triatomíneos do gênero *Panstrongylus*. Estes autores referiram que Z1 e Z3 também infectavam eventualmente o homem na Amazônia, enquanto que Z2 era exclusivo de áreas endêmicas. Numa compilação dos trabalhos já realizados na Região, Coura *et al.* (2002b) concluíram que uma diversificada fauna de mamíferos, representadas por centenas de espécies, atuam na enzootia e compoendo diferentes ciclos de transmissão do *T. cruzi*.

Apenas recentemente, reservatórios silvestres de *T. cruzi* na Amazônia passaram a ser estudados com marcadores moleculares, caracterizando um grande número de isolados de macacos, marsupiais, roedores e morcegos em trabalhos que publicamos e são apresentados nos anexos 1 a 4 desta tese (Marcili *et al.*, 2009a; 2009b; Valente S. *et al.*, 2009; Pinto A *et al.*, 2008).

O primeiro caso de doença de Chagas na Amazônia ocorreu em 1940, na Guiana Francesa, quando uma criança de sete anos foi diagnosticada com a observação de formas amastigotas de *T. cruzi* em material de punção do esterno (Floch & Tasqué, 1941). Nesse país, outros casos autóctones seriam registrados com infecções subclínicas além de raras infecções agudas com história de cefaleia, mialgia e febre prolongada (Floch & Camain, 1948).

Para detectar infecção chagásica na Região Amazônica, Deane L (1963; 1964c) realizou as primeiras pesquisas sorológicas em populações do Amapá e Pará, com resultados sempre negativos. No Pará, o trabalho foi realizado em Cachoeira do Arari, Marajó, e foi encontrado um indivíduo com sorologia positiva (reação de Machado e Guerreiro) sem sinais clínicos e alterações eletrocardiográficas e com exames parasitológicos negativos. Somente em 1968 os primeiros casos agudos autóctones de doença de Chagas na Amazônia Brasileira foram descritos na cidade de Belém, em quatro indivíduos de uma mesma família e domicílio (Shaw *et al.*, 1969).

Até o final da década de 80 foram descritos mais 18 casos agudos: sendo 6 no Pará (Lainson *et al.*, 1979; Silveira *et al.*, 1979; Dórea *et al.*, 1981; Rodrigues *et al.*, 1985); 9 casos no Amapá (Lacerda Jr. *et al.*, 1974; Rodrigues *et al.*, 1988); 1 caso no estado do Amazonas (França *et al.*, 1980) e 1 caso no Estado do Acre (Barata *et al.*, 1988).

Entre os anos de 1975 e 1980 foi realizado, pela extinta Superintendência de Campanha de Saúde Pública (SUCAM) do Ministério da Saúde, o Inquérito Sorológico Nacional de Doença de Chagas (Camargo *et al.*, 1984). Os percentuais de soro-prevalência para a doença de Chagas encontrados na Amazônia Brasileira foram: 0% no Amapá, 0,3% em Roraima, 0,4% em Rondônia, 0,6% no Pará, 1,9% no Amazonas e 2,4% no Acre. Estes números, alguns considerados elevados, levantaram hipóteses de reações cruzadas com outras doenças, especialmente leishmanioses (Afchain *et al.*, 1979; Lopes *et al.*, 1981). Outra justificativa atribuía os casos de doença de Chagas a migrantes de áreas endêmicas estabelecidos na Região que já chegaram infectados (Pandolfo, 1994).

Inquéritos realizados em Barcelos, Estado do Amazonas, apresentaram índices elevados (12,5%) de soro-prevalência para anticorpos anti-*T. cruzi* sem, contudo, observação de formas clínicas típicas e confirmação por exames parasitológicos (Coura *et al.*, 1994; 1995). Os autores aventaram a possibilidade de baixa virulência e parasitemia das cepas circulantes, proporcionando uma infecção subclínica e de difícil detecção parasitológica. Posteriormente, os autores admitiram a possibilidade de resultados falsos positivos e a necessidade de utilização de outras técnicas sorológicas da doença de Chagas nessa Região. Novos inquéritos realizados nas regiões do Médio e Alto Rio Negro com métodos sorológicos mais específicos revelaram prevalências mais baixas quando as amostras com positividade foi de 6,3% confirmadas pelo teste de imunofluorescência indireta, 7,9% quando detectadas pelo epi-ELISA e 6,9% pelos antígenos recombinantes CRA e FRA recELISA (Umezawa *et al.* 1996; 2004). Outro estudo realizado na mesma Região mostrou que *Trypanosoma rangeli* foi responsável por infecções em três indivíduos com manifestações subclínicas (Coura *et al.*, 1996).

Portanto, o diagnóstico sorológico da doença de Chagas realizado por métodos convencionais apresenta problemas de sensibilidade e especificidade na Amazônia. Os resultados obtidos são conflitantes e, dentre os motivos sugeridos, estão reações cruzadas com *T. rangeli* (falso positivo) e baixos títulos de anticorpos (falso negativo), assim, dados sorológicos da doença nessa Região devem ser analisados com cautela (Camargo *et al.*, 1984; Coura *et al.*, 1995; 2002b; Junqueira, 2005).

A maioria dos casos de doença de Chagas na Amazônia foi diagnosticada na fase aguda, sendo raros os casos crônicos comprovados, e pouco se sabe sobre a evolução clínica dessa doença na Região (Fraiha *et al.*, 1995; Coura *et al.*, 2002a; Valente V. *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2002a; Xavier *et al.*, 2006). De acordo com Teixeira *et al.*, (2001) para cada caso agudo notificado, podem ser estimados de 20 a 100 outros casos, o que potencializa a gravidade da doença na Região.

Apesar de crescente o número de casos agudos, os relatos dessa fase da doença são escassos na literatura regional. Assim, Pinto *et al.* (1993) descreveram um caso agudo pediátrico de doença de Chagas em Cachoeira do Arari, com intenso e prolongado quadro febril positivo na gota espessa para *T. cruzi*. Posteriormente, Pinto *et al.* (2001) descreveriam o acometimento de formas cardíacas graves de fase aguda em Abaetetuba, Pará. Síndrome semelhante ocorreria novamente entre pacientes de um surto em Cametá, também no Pará, descrita por Pinto *et al.* (2004). Nos dois surtos ocorreram 4 óbitos. Mais recentemente, Pinto *et al.* (2009), apresentaram o perfil clínico, sorológico e epidemiológico de 233 casos de fase aguda que apresentavam uma diversidade de sintomas e estavam majoritariamente associados aos inúmeros surtos regionais, sobretudo, dos estados do Pará e Amapá com características de transmissão pela via oral.

A endemicidade da doença de Chagas na Região Amazônica, foi sugerida inicialmente por Fraiha *et al.* (1995). É considerada por Coura (1990; 2007) como endêmica e emergente na Região devido ao crescimento anual e a regularidade dos casos no nordeste do Pará, sudeste do Amapá e Amazonas, independente da domiciliação de vetores triatomíneos. O reconhecimento desse quadro endêmico foi corroborado pelo Ministério da Saúde atendendo às recomendações do Consenso Brasileiro de Doença de Chagas, que estabeleceu Programas Estaduais para conhecimento da epidemiologia, vetores, reservatórios, meios de transmissão e adoção de medidas que proporcione controle e notificação da doença nesses Estados (Valente S. *et al.*, 1999a; Brasil, 2005; Coura *et al.*, 2002a; Coura, 2007; Dias *et al.*, 2002a; 2007).

Há registros de pelo menos 363 casos de infecção chagásica crônica na Amazônia de acordo com inquéritos regionais, além de 1.245 indivíduos com sorologia positiva e história clínica compatível, mas sem diagnóstico confirmado (comunicação pessoal, S.A.S. Valente, 2011) e (Coura *et al.*, 1997). No estado de Rondônia, apesar da falta de registros oficiais de doença de Chagas aguda (DCA), levantamento feito por Drumond & Marcopito (2006) apontaram 3 óbitos por doença de Chagas no período de 1981 a 1998.

No recente inquérito sorológico nacional realizado entre 2002 e 2007, sem contar com amostras do Estado do Pará, um total de 102.571 pessoas examinadas, apenas 30 menores apresentaram sorologia positiva. Porém, esses menores eram oriundos dos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Bahia, Pernambuco, Ceará, Paraíba e Alagoas, sendo que as mães de 60% das crianças eram também soropositivas sugerindo transmissão congênita. As pesquisas entomológicas realizadas durante esse inquérito não detectaram triatomíneos domiciliados, indicando a interrupção da transmissão vetorial por triatomíneos domiciliares (Dias *et al.*, 2007). Estes dados poderiam mascarar a real situação do Estado de maior importância na atual transmissão da DCA no Brasil.

Portanto, a doença de Chagas na Região Amazônica Brasileira vem sendo continuamente descrita desde os primeiros registros de Shaw *et al.* (1969). Nos últimos anos, houve um grande aumento do número de casos na Região atribuído principalmente aos surtos associados à via oral (Valente S. *et al.*, 1999b; 2009; Coura *et al.*, 2002b; Xavier *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2007).

Na mais recente casuística da Amazônia, foram registrados 1.125 casos autóctones até fevereiro de 2011 – 99,1 % deles diagnosticados em fase aguda – 24 fatais (letalidade de 2,13 %) (INSTITUTO EVANDRO CHAGAS, fev. 2011 – Dados referentes à Doença de Chagas, não publicados). A distribuição dos casos autóctones regionais por Unidade Federativa é a seguinte: 752 (66,85 %) no Estado do Pará, 249 (22,13 %) no Amapá, 72 (6,40 %) no Amazonas, 36 (3,20 %) na Pré-Amazônia Maranhense e 16 (1,42 %) no Acre (INSTITUTO EVANDRO CHAGAS, 2011). Figura 1.

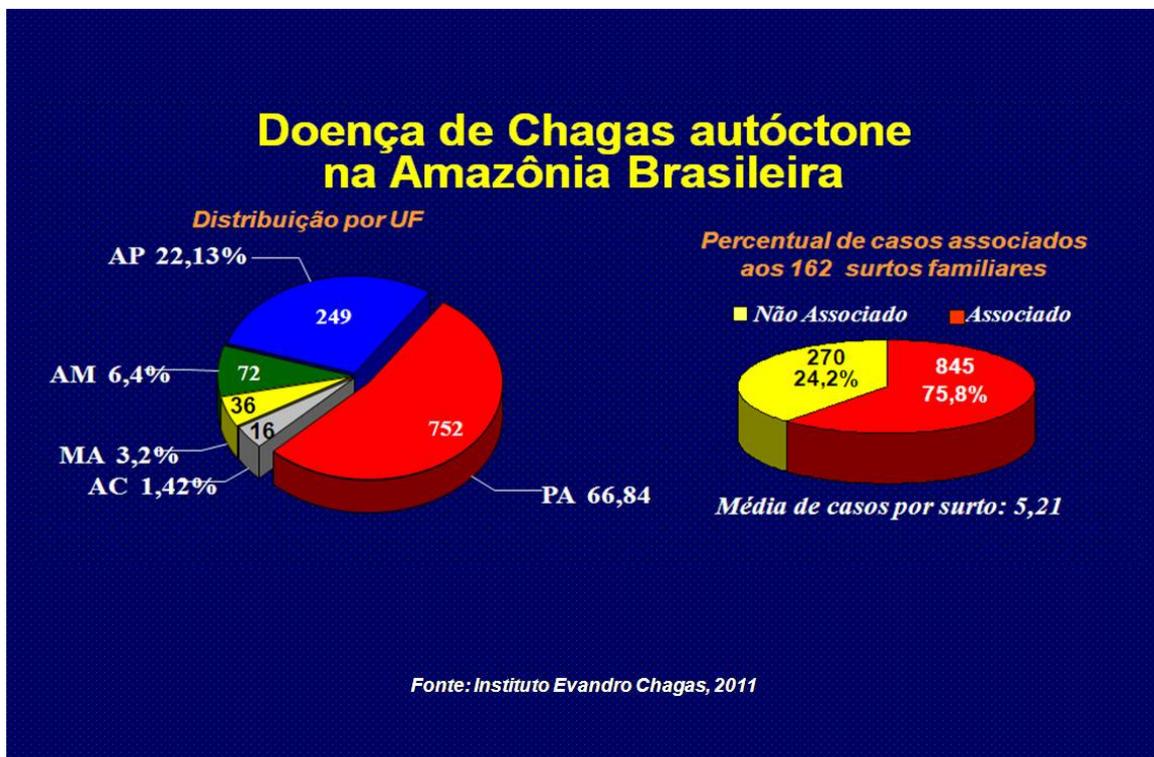


Figura 1. Distribuição dos casos de doença de Chagas por UF e proporção de casos associados ou não à transmissão pela via oral.

Até fevereiro de 2011 foram registrados 162 surtos no Brasil, 155 deles no espaço amazônico, 125 dos quais só no Estado do Pará (Figura 2). Dos casos agudos autóctones registrados na Amazônia, 75,8 % estavam relacionados a algum surto. A média de casos por surto foi de 5,21 (INSTITUTO EVANDRO CHAGAS, 2011).



Figura 2. Distribuição dos surtos de doença de Chagas no Brasil, 1965 a 2011. Fonte: Instituto Evandro Chagas e Secretaria estadual de Saúde Pública do Pará, 2011.

1.2. ECOEPIDEMIOLOGIA DE VETORES E RESERVATÓRIOS DE *T. CRUZINA* NA AMAZÔNIA

1.2.1. Vetores

O principal fator limitante da completa endemização da doença de Chagas na Região Amazônica está relacionado à ausência de espécies de triatomíneos com grande potencial de domiciliação na fauna regional e a incapacidade, até o momento, de adaptação de espécies procedentes das áreas endêmicas. Todas as espécies de triatomíneos da Amazônia, exceto *Triatoma rubrofasciata* (associado com o rato doméstico), são de hábitos silvestres, essencialmente zoófilos, com pequena capacidade de dispersão pelo vôo. Eventualmente, adultos de *R. pictipes* e *P. geniculatus* originários do ciclo enzoótico natural, invadem as casas atraídos pela luz, podendo ao se alimentar do sangue dos moradores dar origem a casos de DCA (Silveira *et al.*, 2002; Coura *et al.*, 2002a; Galvão *et al.*, 2003). Embora *T. maculata* (associado com aves) e *P. geniculatus* (associado com porco doméstico) tenham sido encontrados muito próximos do domicílio do homem, não foram confirmadas a domiciliação de nenhuma espécie de triatomíneos nesta Região, apenas a presença eventual de triatomíneos adultos (Valente V. *et al.*, 1998; Luitgards-Moura *et al.*, 2005).

Os primeiros estudos dos triatomíneos na Região Amazônica Brasileira surgiram com Ferreira & Deane L (1938b) que encontraram *R. pictipes* e *P. geniculatus*. Rodrigues & Melo (1942), em

trabalhos realizados no bairro do Aurá, cercanias de Belém, infectadas por flagelados do tipo *T. cruzi*, porém, não detectaram infecção em *Eratyrus mucronatus* e *P. rufotuberculatus*. Almeida (1971) e Almeida & Machado (1971) reportaram próximo a Manaus, triatomíneos silvestres (*R. pictipes*, *R. robustus* e *P. geniculatus*) infectados com tripanossomas do tipo *T. cruzi*.

Posteriormente, trabalhando em matas primárias nos arredores de Belém (Pará), e até mesmo em domicílios de área urbana, Lainson *et al.* (1979) e Miles *et al.* (1981b) encontraram exemplares de diversas espécies de triatomíneos, entre elas *P. geniculatus*, *R. pictipes* e *P. lignarius*, infectados com *T. cruzi*. Em Tucuruí, Sudeste do Pará, Mascarenhas (1986) encontraram *R. robustus*, *R. pictipes*, *P. geniculatus*, *P. lignarius* e *Microtriatoma trinidadensis* em vários ecótopos. Exemplares das três primeiras espécies revelaram infecção por tripanossomas semelhante ao *T. cruzi*. Por outro lado, na cidade de Manaus (AM) Naiff *et al.* (1998) observaram vetores silvestres esporadicamente encontrados em domicílios humanos, muitas vezes infectados por *T. cruzi*. Entre exemplares adultos das espécies coletadas, a mais frequente foi *R. pictipes*, que ocorre durante o ano todo, enquanto *P. geniculatus* ocorre principalmente na estação seca.

P. geniculatus é a espécie silvestre de maior distribuição na América do Sul e Central. Embora as colônias não sejam geralmente numerosas, os adultos apresentam taxas elevadas de infecção por *T. cruzi* e, eventualmente, são encontrados no peridomicílio e nos domicílios em áreas rurais e ribeirinhas da Amazônia (Miles *et al.*, 1978; Valente V. *et al.*, 1998). Essa espécie reportada também no Equador, Peru, Bolívia, Colômbia e na Venezuela, ocorre do Norte ao Sul do Brasil. Especula-se que *P. geniculatus* assumira um importante papel substituindo *R. prolixus* na transmissão da doença de Chagas (Carrasco *et al.*, 2005). Valente V. *et al.* (1998) encontraram colônias de *P. geniculatus* junto com porcos domésticos no peridomicílio na Ilha de Marajó, evidenciando seu potencial de colonização do domicílio humano. Essa espécie também foi encontrada em palmeiras de *M. regia*, inajá e *S. martiana*, urucurizeiro e pode estar associada com a transmissão de doença de Chagas na Região marajoara (Valente V. *et al.*, 1998; Valente S. *et al.*, 2009). Em Roraima foram encontradas colônias de *T. maculata* no peridomicílio e, esporadicamente, em domicílios. Porém, sua preferência alimentar por aves tem evitado a infecção com *T. cruzi* e limitado seu papel na transmissão da doença de Chagas para o homem (Luitgards-Moura *et al.*, 2005; Abad-Franch & Monteiro, 2007).

Os vetores de *T. cruzi* mais abundantes e dispersos por toda a Amazônia pertencem ao gênero *Rhodnius* que compreendem espécies exclusivamente silvestres, distribuídas entre os variados ecótopos e regiões da Amazônia, sendo as palmeiras seus ecótopos preferenciais. Das 19 espécies de triatomíneos da Região, 11 já foram encontradas infectadas por *T. cruzi*, sendo potenciais vetores da doença de Chagas na Amazônia (Barret & Guerreiro, 1991; Gaunt & Miles, 2000; Miles *et al.*, 1981b; Valente V. *et al.*, 1998; Coura *et al.*, 2002a; Teixeira *et al.*, 2001; Abad-Franch *et al.*, 2005).

Estima-se que as palmeiras existam há pelo menos 65 milhões de anos, predominando na vegetação de uma área estimada em 20.000 km² ao longo da Bacia Amazônica (Barret & Guerrero, 1991), e são abrigos de diversas espécies de triatomíneos. *R. pictipes* e *R. robustus* com preferência pelas espécies inajá, dendê, babaçu e urucurizeiro (Miles *et al.*, 1981b). Na Região do Rio Negro (AM) a principal espécie é *Rhodnius brethesi*, que habita exclusivamente palmeiras de piaçava, geralmente, em associação com pequenos répteis e mamíferos (Mascarenhas, 1986; 1987; 1991). A doença de Chagas encontrada em Barcelos foi associada, sobretudo, às populações que trabalham na extração de piaçava, fibra da palmeira *Leopoldinia piassaba*, frequentemente expostas ao vetor *R. brethesi*, ali conhecidos como “piolhos da piaçava”. Coura *et al.* (1994) descreveram num piaçabal o ataque de populações humanas por estes triatomíneos adultos já com a probóscida armada para picar, “como se fosse uma Glossina (mosca tsé-tsé)”.

A presença de *R. robustus* tem sido referida em grandes áreas da Amazônia, principalmente no Pará, Amazonas e Rondônia. Palmeiras de *Orbygnia speciosa*, babaçu, constituem ecótopos ideais para grandes colônias de *R. robustus* que vivem com diversas espécies de invertebrados e vertebrados que servem como fonte alimentar, incluindo lagartos, aves, roedores, gambás e morcegos. O conjunto de pequenos répteis, mamíferos, triatomíneos e outros invertebrados que habitam as palmeiras da Amazônia são elementos de grande importância para a manutenção da cadeia trófica do *T. cruzi* (Gaunt & Miles, 2000; Teixeira *et al.*, 2001).

A metodologia de seguimento de mamíferos até seus refúgios, desenvolvida por Miles (1976), permitiu identificar os ecótopos naturais da maioria das espécies de triatomíneos da Amazônia Brasileira: *R. pictipes*, *R. robustus*, *P. geniculatus*, *P. lignarius*, *P. rufotuberculatus*, *E. mucronatus*, *M. trinidadensis* e *Belminus herreri*. Os ecótopos identificados foram: buracos em paus e troncos de árvores ocadas (*E. mucronatus* e *P. lignarius*), pequenas cavidades em árvores altas (*P. lignarius* e *R. paraensis*), buracos profundos no chão da mata (*P. geniculatus*) e folhas dobradas em ninhos de animais instalados na coroa de palmeiras inajá (*Maximiliana regia*), mucajá (*Acrocromia sclerocarpa*) e babaçu (*Orbygnia phallerata*) (*R. robustus*, *R. pictipes* e *M. trinidadensis*). Esses ecótopos foram confirmados em trabalhos subsequentes de Miles *et al.* (1981b; 1986). O método tem sido útil no estudo da eco-epidemiologia do *T. cruzi*, permitindo inclusive a descrição de uma nova espécie de triatomíneo, *Rhodnius paraensis* (Sherlock *et al.*, 1977).

Rhodnius milesi foi a última espécie de triatomíneo na Amazônia Brasileira, o (Valente V. *et al.*, 2001), e encontrada em grandes colônias na copa de palmeiras *M. regia* (inajá) no Município de Bragança, Pará. Moradores têm relatado que, eventualmente, adultos famintos entram nos domicílios atraídos pela luz e tentam alimentar-se no homem e em animais domésticos. O ciclo evolutivo, a

associação com mamíferos silvestres e a infecção natural com a linhagem TCI de *T. cruzi* foram estudados preliminarmente por Silva *et al.* (2005).

Achados de *R. prolixus* nos Estados do Amazonas, Pará e Rio de Janeiro, classificados de acordo com a taxonomia tradicional (Galvão *et al.*, 2003), têm sido questionados quando comparados com marcadores moleculares devido à grande semelhança desta espécie com *R. robustus* (Monteiro *et al.*, 2003; Miles *et al.*, 2003).

A transmissão da doença de Chagas por vetores silvestres, em zonas rurais e peri-urbanas da Amazônia, tem sido predominantemente relacionada com *R. robustus*, *R. pictipes* e *P. geniculatus*, que invadem os domicílios sem colonizá-los, geralmente atraídos pela luz (Dias *et al.*, 2002a; 2002b; Coura *et al.*, 2002b; Carrasco *et al.*, 2005). Onde há triatomíneos infectados próximos dos domicílios, geralmente devido à falta de alimento no ambiente natural causada pelo desmatamento de florestas primárias, há maior risco de invasão dos domicílios por triatomíneos, colonização, e risco de transmissão doméstica da doença de Chagas (Noireau *et al.*, 1995; 2005; Galvão *et al.*, 2003).

Considerando que 11 espécies de triatomíneos já foram encontradas infectadas naturalmente pelo *T. cruzi* na Amazônia, o potencial de transmissão vetorial é grande. As espécies mais envolvidas na transmissão para o homem são as do gênero *Rhodnius*, porque são as mais abundantes na Região e vivem em palmeiras ao lado das habitações cujas palmas servem como cobertura de moradias, as fibras utilizadas para confecção de utensílios domésticos e os frutos são consumidos frescos pela população e por animais domésticos locais (Abad-Franch & Monteiro, 2007; 2010).

A domiciliação dos vetores da doença de Chagas depende fundamentalmente da ação do homem sobre o ambiente natural, que pode levar ao deslocamento dos triatomíneos de seus ecótopos silvestres para residências humanas. Na Amazônia, a domiciliação desses vetores ainda não ocorreu devido à relativa preservação ambiental. Entretanto, alguns estados como Pará, Rondônia e Acre sofreram grandes transformações nas últimas décadas, com uma faixa representativa da floresta substituída por pastagens e agricultura (Alves, 2007; Brasileiro, 2009; Briceno-Leon, 2009). As pastagens foram invadidas por palmeirais (babaçu), o nicho preferido dos triatomíneos e embora nestes estados tenha havido desmatamento de extensivas áreas e grande migração humana de áreas endêmicas do Sul e Nordeste do Brasil, não ocorreu domiciliação de triatomíneos nativos, nem introdução de espécies alóctones. Provavelmente, os triatomíneos se mantêm em seus ecótopos devido às condições muito favoráveis existentes nas palmeiras locais (babaçu) que apresentam um ecossistema muito rico e diversificado, com diversas e abundantes fontes alimentares (Teixeira *et al.*, 2001; Abad-Franch & Monteiro, 2007; Coura, 2007; Abad-Franch *et al.*, 2010). Entretanto, em outras áreas da Amazônia as palmeiras estão sendo eliminadas com a floresta. Portanto, o risco de futura adaptação de espécies introduzidas em áreas muito degradadas da Amazônia é bastante considerável

e deve ser monitorado, principalmente nas áreas colonizadas por migrantes de áreas endêmicas (Araújo *et al.*, 2009).

Valente V. *et al.* (2004) investigando casos agudos de doença de Chagas no município de Abaetetuba, no Pará, observaram que o desmatamento tem contribuído para o avanço de algumas espécies de triatomíneos. Em trabalhos de campo realizados nestes locais as espécies mais coletadas na mata vizinha das moradias e coletadas pelos moradores foram *R. pictipes* e *P. geniculatus*, com taxas de infecção para tripanossomas de 57,77% e 61,5% respectivamente.

A domiciliação de triatomíneos nas regiões endêmicas da doença de Chagas foi possível devido à degradação da paisagem natural, redução das fontes alimentares originais e a facilidade de adaptação de algumas espécies a novos ambientes e fontes de alimentação. *R. prolixus* e *T. infestans* foram introduzidos pelo homem em áreas onde não ocorriam e se estabeleceram com grande sucesso (Schofield, 1988; 2000; Schofield *et al.*, 1999; Coura, 2007). Dentre os triatomíneos existentes na Amazônia brasileira, até o momento somente *T. rubrofasciata* foi introduzido pelo homem. Porém, essa espécie se adapta a ambientes urbanos restritos e infestados de ratos domésticos, animais pelos quais têm marcada preferência alimentar. Deane M (1947), Lainson *et al.* (1979) e Valente S *et al.* (1987) encontraram colônias de *T. rubrofasciata* no bairro da Cidade Velha em Belém, infectados com *Trypanosoma conorrhini*, mas não com *T. cruzi*, vivendo nos domicílios humanos associados ao rato doméstico. Por outro lado, Valente S *et al.* (1995) e Marcili *et al.* (2009a) analisaram as amostras isoladas dessa espécie em bairros de São Luís, estado do Maranhão e os isolados genotipados foram caracterizados como *T. cruzi* Tc1 participando no ciclo doméstico entre ratos domésticos e *T. rubrofasciata*.

Apesar dos avanços significativos (Gaunt & Miles, 2000; Monteiro *et al.* 2000; 2001; Abad-Franch *et al.* 2005; 2009; 2010), ainda se conhece pouco sobre as espécies de triatomíneos e sua distribuição na Amazônia, as associações com ecótopos como as espécies de palmeiras, os fatores de dispersão e aquelas que mais facilmente seriam adaptáveis a ecótopos artificiais e, assim, mais importantes na transmissão da infecção para o homem, etc. Além dos estudos morfológicos realizados com diversas espécies regionais, os estudos moleculares e filogeográficos de triatomíneos da Amazônia se restringem a *R. robustus*, que se mostrou um complexo de populações geneticamente distintas (Monteiro *et al.*, 2003). Estudo em andamento tem demonstrado que *R. pictipes* também compreende um complexo de populações geneticamente distintas e separadas geograficamente (Abad-Franch *et al.*, 2009).

Segundo Araújo *et al.* (2009) a Amazônia é hoje uma nova fronteira para a doença de Chagas e uma preocupação adicional diante das dificuldades de qualquer intervenção para controle vetorial. A maioria dos casos de doença de Chagas nessa Região tem sido associada a surtos de

infecção oral Beltrão *et al.* (2009), sem domiciliação vetorial. A presença de triatomíneos contaminando alimentos com formas infectantes de *T. cruzi* parece ser a principal fonte de infecção nos surtos de DCA (Pinto *et al.*, 2001; 2004; Valente S. *et al.*, 2006; 2009; Pinto *et al.*, 2009; Marcili, *et al.*, (2009a). Por outro lado, *R. brethesi* tem sido considerado importante na transmissão vetorial da doença de Chagas na Região do Rio Negro, Amazonas, onde a doença não tem sido associadas a surtos de infecção oral, mas sim a atividade de extração da piaçava (Coura *et al.*, 2002b) e Coura, 2007; Junqueira *et al.*, 2005).

Combater a doença de Chagas na Região prescinde de um eficiente sistema de VE. É fundamental que os agentes de saúde sejam capazes de reconhecer os triatomíneos regionais e seus ecótopos naturais, detectar e acompanhar a aproximação de espécies silvestre ao domicílio do homem, verificar as taxas de infecção por *T. cruzi* e intervir com medidas de controle, inclusive a aplicação de inseticidas quando necessário (Villela *et al.*, 2007; Brasil, 2009). Estudos taxonômicos, biológicos, de distribuição e de dispersão, preferências alimentares e de ecótopos dos triatomíneos necessitam ser continuados e aprofundados (Noireau *et al.*, 2000; Abad-Franch *et al.*, 2009).

O Brasil foi considerado livre da transmissão da doença de Chagas por triatomíneos domiciliares, sobretudo pelo *T. infestans*. Esse êxito foi alcançado com a iniciativa dos Países do Cone Sul que possibilitou a aplicação sistemática de inseticidas de ação residual que levou o Brasil a receber a certificação de interrupção da transmissão vetorial tradicional (Silveira, 2002; Dias, 2006). As atenções se voltam agora para as espécies de triatomíneos de importância secundária e silvestres. Apesar dos registros de invasões esporádicas de domicílios, é difícil especular quais espécies poderiam ser mais facilmente adaptadas ao domicílio devido à escassez dos estudos específicos sobre esse tema. As espécies candidatas a adaptação seriam aquelas já descritas no interior de domicílios. *P. rufotuberculatus* foi encontrado colonizando domicílios na Bolívia (Noireau *et al.* 1994; Dujardin *et al.*, 1998). *E. mucronatus* foi encontrado em domicílios no Peru e Bolívia (Valencia-Telleria, 1990; Noireau *et al.* 1995). *Rhodnius stali* foi descrito colonizando domicílios na Bolívia (Tibayrenc & Le Pont, 1984). Na Venezuela, *P. geniculatus* tem sido associados a casos humanos e divide com *R. prolixus* a importância na transmissão vetorial da doença de Chagas (Carrasco *et al.* 2005); *T. rubrovaria* tem sido encontrado no peridomicílio na Argentina e Uruguai e pode vir a ser epidemiologicamente importante no Sul do Brasil (Martins *et al.*, 2008). *Triatoma vitticeps* comum na Mata Atlântica do Sudeste do Brasil apresenta altas taxas de infecção no peridomicílio de áreas rurais no Espírito Santo (dos Santos *et al.* 2005) e em Minas Gerais (Souza *et al.* 2008) e devido à grande proximidade com aglomerados humanos, tem sido encontrado em residências. Amostras de tripanossomas isoladas desta espécie coletadas no Estado do Rio de Janeiro foram caracterizados molecularmente

como *T. cruzi* (Santos-Mallet *et al.*, 2008). Mais recentemente, Dib *et al.* (2009) referiram que *Eratyrus cuspidatus* estaria incriminado com a transmissão de casos de DCA no Norte da Colômbia.

1.2.2. Reservatórios, ciclos e vias de transmissão de *T. cruzi* na Amazônia

A infecção por *T. cruzi* é originalmente uma zoonose e o parasito apresenta um grande número de espécies hospedeiras, que são mamíferos de praticamente todas as ordens, com mais de 180 espécies de animais silvestres já descritas infectadas, principalmente espécies das Ordens Marsupialia, Rodentia, Chiroptera, Primata, Carnivora, Xenarthra e Artiodactyla. Com exceção dos mamíferos marinhos das ordens Sirenia e Cetacea, todos os mamíferos podem ser infectados por *T. cruzi*. No ciclo silvestre, a transmissão é mantida por mamíferos e triatomíneos que habitam diferentes ecótopos representados por palmeiras, fendas em árvores e rochas, buracos no solo e abrigos de animais. Os principais ciclos de transmissão vetorial de *T. cruzi* são: a) exclusivamente silvestre; b) predominantemente silvestre raramente envolvendo o homem de forma acidental; b) doméstico, que envolve o homem, animais domésticos e silvestres do peridomicílio e triatomíneos domiciliados; c) peridoméstico, com a sobreposição dos ciclos silvestre e domiciliar (Miles *et al.*, 1979, 2003, 2009; Schofield, 2000; Gaunt & Miles, 2000; Abad-Franch *et al.*, 2010).

A infecção humana é encontrada do México ao Chile e Argentina nos mais diversos ambientes altiplanos andinos; florestas Amazônica e Atlântica; cerrado; caatinga, etc. Como enzootia a tripanossomíase americana é mais amplamente distribuída do que a infecção humana, estendendo-se do Sul dos Estados Unidos até a Patagônia, e transmitida por uma maior diversidade de triatomíneos (Coura *et al.*, 2002a; Miles *et al.*, 2003;). Na Amazônia Brasileira, *T. cruzi* circula exclusivamente no ambiente silvestre, apesar da transmissão frequentemente ocorrer no ambiente doméstico, predominantemente por via oral com a ingestão de polpas de frutas contaminadas, ou vetorial por triatomíneos atraídos pela luz (Miles *et al.*, 1981b; 2003; Valente S *et al.*, 1999 a,b; Coura *et al.*, 2002a, 2007; Dias *et al.*, 2002a; Aguilar *et al.*, 2007; Valente S *et al.*, 2009).

A infecção por *T. cruzi* na Amazônia é uma enzootia altamente prevalente. Chagas (1924a) foi o primeiro a identificar esse protozoário em macacos *Chrysothrix sciureus* capturados no Pará. Deane L *et al.* (1970) comprovaram que 63% de macacos do Estado do Amazonas apresentavam tripanossomas. Outros estudos confirmaram as altas taxas de infecção destes animais na Amazônia (Zicardi *et al.*, 2000, 2005; Maia da Silva *et al.*, 2008). Estudo com macacos em cativeiro na Amazônia revelou animais infectados com *T. cruzi* da linhagem TCI, enquanto macacos da Mata Atlântica foram encontrados infectados com as linhagens TCI e TCII (Lisboa, *et al.*, 2006a).

Marsupiais do gênero *Didelphis* são as espécies que apresentam as maiores prevalências de infecção por *T. cruzi* em toda a América Central e do Sul, inclusive na Região Amazônica. Esses animais estão associados à linhagem TCI, transmitida por espécies de *Rhodnius* em ecótopos arbóreos, especialmente palmeiras. Marsupiais do gênero *Monodelphis* também foram encontrados infectados por *T. cruzi* na Amazônia, porém, nesses animais predomina zimodema 3 (linhagem TCIIc = TcIII), que é transmitida por *P. geniculatus* (Póvoa *et al.*, 1984; Yeo *et al.*, 2005).

As vias vetorial, transfusional, oral e transplacentária são as mais importantes formas de transmissão da doença de Chagas. A via vetorial é a forma clássica de transmissão, e ocorre com a contaminação com fezes de triatomíneos infectados. O sucesso dessa via depende de contato duradouro do hospedeiro com os vetores (Silveira, 2000; Silveira *et al.*, 2002; Coura, 2007). A via transfusional, devido ao eficiente sistema de triagem de doadores nos bancos de sangue, sofreu redução significativa no Brasil (Dias *et al.* 2008). Por outro lado, a via transfusional vem assumindo importância nos Estados Unidos e na Europa pela crescente imigração de latinos de países endêmicos e a falta de controles específicos nos bancos de sangue (Click Lambert *et al.*, 2008; Kjos *et al.*, 2008). A via congênita tem sido associada a casos de DCA na Argentina e Bolívia que criaram programas para seguimento desses pacientes (Gürtler *et al.* 2003; Torrico *et al.*, 2004, 2005).

1.2.2.1. Transmissão vetorial

A principal forma de transmissão nas regiões endêmicas é a vetorial, sobretudo em áreas de alta densidade de triatomíneos domiciliares antropofílicas (*T. infestans*, *T. dimidiata*, *T. braziliensis*, *T. sordida*, *R. prolixus* e *P. megistus*) que infestam domicílios na América do Sul e Central. No Brasil, após a interrupção da transmissão vetorial, o encontro de triatomíneos em domicílios nas antigas áreas endêmicas é um evento cada vez mais raro, e quando ocorre se dá por espécies secundárias ou silvestres, até o momento, sem grande relevância na transmissão (Silveira, 2002; Dias *et al.*, 2008).

Na Região Amazônica a transmissão vetorial tem sido responsabilizada por aproximadamente um quarto dos casos de doença de Chagas aguda nos Estados do Pará e Amapá, associados principalmente a *R. pictipes* e *P. geniculatus*, espécies que tem forte atração pela luz e adultos podem ser encontrados em domicílios (Naiff *et al.*, 1998; Valente V *et al.*, 1998; Coura *et al.* 2002a; Aguilar *et al.*, 2007; Abad-Franch, *et al.*, 2009). Na Região do Alto e Médio Rio Negro, *R. brethesi* é a espécie epidemiologicamente importante e a infecção tem características profissionais, afetando famílias que vivem em acampamentos durante o período da extração da piaçava e são atacadas por esses triatomíneos (Coura *et al.*, 1994; 1999; 2002a).

Além da transmissão de *T. cruzi* pela contaminação com formas metacíclicas presentes nas fezes dos triatomíneos, tripomastigotas metacíclicas também se desenvolvem na glândula anal de gambás, sendo eliminados junto com a secreção dessas glândulas, dispensando o inseto vetor (Deane M *et al.*, 1984; Jansen *et al.*, 1999). Esse mecanismo tem sido considerado importante na manutenção do ciclo silvestre e, eventualmente, na transmissão da doença de Chagas para o homem. Gambás vivem no peridomicílio, em forros de residências de áreas rurais e nas periferias das cidades, invadindo as casas à procura de alimentos durante a noite quando podem contaminar alimentos que acabam causando infecção humana (Lainson *et al.* 1979; Miles *et al.*, 2003; Shikanai-Yasuda, 1991; Valente S *et al.*, 1999ab, 2006, 2009).

1.2.2.2. Transmissão oral

A transmissão de *T. cruzi* no ciclo enzoótico ocorre, principalmente, por via oral, entre mamíferos que se alimentam ocasionalmente de triatomíneos infectados que, por sua vez, se alimentam do sangue desses animais. No trabalho original de Chagas (1909) a infecção de saguis *Callitrix penicillata* com triatomíneos infectados com *T. cruzi* foi atribuída à ingestão dos insetos. Ainda no ciclo natural, a predação entre mamíferos deve colaborar para a transmissão do parasito. Um mecanismo alternativo de transmissão para outros animais e para o homem é a ingestão de carne crua ou mal cozida (Amunarriz *et al.*, 1991; Valente S *et al.*, 1999b; 2009; Aguilar & Yépez, 1995; Roque *et al.*, 2008). Porém, um estudo recente de Roellig *et al.* (2008) mostrou que guaxinins não se infectam com *T. cruzi* por ingestão de formas de tripomastigotas do sangue.

A transmissão da infecção chagásica por via oral para o homem vem ocorrendo com frequência nas regiões nordeste (Shikanai-Yasuda *et al.* 1991; Dias *et al.* 2008), sul (Coura, 1966; Steindel *et al.* 2008) e principalmente na Região norte, (Pinto A *et al.*, 1999; 2001; 2004; 2008; 2009; Valente S *et al.*, 2001; 2002; 2005; 2009; Coura *et al.*, 2002a; Aguilar *et al.*, 2007). Essa via assumiu grande importância nos últimos anos, constituindo atualmente a mais importante forma de transmissão da doença de Chagas (Coura, 2006) agora que o Brasil recebeu a certificação de interrupção da transmissão vetorial (Dias, 2006a), merecendo portanto um programa específico para o seu controle.

Os primeiros registros oficiais sobre a transmissão experimental de *T. cruzi* pela via oral foram realizados na Argentina por Natan-Larrier (1921), Brumpt (1931), Kofoid & Donat (1933) e Cardoso (1933) em mamíferos que se infectaram com fezes de triatomíneos. Posteriormente, outros autores discutiram a possibilidade de contaminação acidental de alimentos com *T. cruzi* (Vergani, 1952; Diaz Ungría, 1968). Mayer (1961) e Diaz Ungría (1964; 1967a) observaram que animais experimentais podem se infectar por alimentos contaminados com *T. cruzi*. A transmissão deste parasito pela via oral

de diferentes hospedeiros com diversos vetores foi bastante estudada (Rickmann, 1966; Gomesa, 1966; Diaz Ungría, 1969; Diaz Ungría & Soto Bracho, 1970; Diaz Ungría & Zeuss 1971; Davis, Russel & Adams 1980, Lainson *et al.*, 1980).

Estudos de infecção experimental por *T. cruzi* pela via oral em camundongos descreveram a rota das formas tripomastigotas metacíclicas inoculadas oralmente, que escapam da ação do suco gástrico protegendo-se na camada de mucina e atravessando a mucosa gástrica. A infecção de células da parede do estômago ocorre via ativação de sinais nas células hospedeiras desencadeadas por diferentes moléculas de superfície dos parasitos. A invasão de cepas distintas de *T. cruzi* nas células depende de diferentes glicoproteínas de superfície (gp82, gp30, gp90) e apresenta variados níveis de invasão. Algumas cepas levam a uma exacerbação da infecção quando camundongos são infectados pela via oral. Infecções com isolados da linhagem TCI, os mais comuns nos casos humanos da Amazônia, desencadearam infecções mais graves comparadas a infecções por via intra-peritonal (Cortez *et al.*, 2006; Covarrubias *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2006; 2008).

Os primeiros registros de infecção humana pela via oral foram registrados na Argentina quando Mazza (1936) descreveu um caso pediátrico, por ingestão de leite materno infectado por *T. cruzi*. Levantamento histórico sobre doença de Chagas oral organizado por Storino & Jörg (1994) destacam dois episódios de fase aguda no Chaco argentino. Um caso relatado pela mãe de uma criança que disse ter o filho adoecido após a ingestão de remédio caseiro contendo sangue fresco de tatu. O segundo caso foi referido num individuo que adoeceu após ter ingerido diariamente carne crua de animais silvestres (pacas, tatus e gambás) durante uma caçada (Mazza & Schurman, 1930; Mazza *et al.* 1931). Ainda Mazza, *et al.* (1936) e Tállice (1964) na Argentina, aventaram a possibilidade de infecção oral pelo *T. cruzi* quando investigaram casos clínicos cuja transmissão vetorial ou transfusional haviam sido descartadas. Carpintero (1978) identificou que entre 1000 pessoas com infecção chagásica comprovada, um terço não tinha nenhum contato com triatomíneos, ou com sangue transfundido, porém, ingeriam carne de animais silvestres quase cruas seguindo costumes tribais.

No Equador, Amunarriz *et al.* (1991) e Aguilar & Yépez (1995) relataram estudos sorológicos entre nativos quíchuas da Amazônia equatoriana com índices de infecção por *T. cruzi* de 6,03%. Nessa Região, a ingestão de carne de animais silvestres, importante fonte alimentar, pode ser a via responsável por doença entre os índios. Na Colômbia, Rodriguez *et al.* (1992) descreveram um surto com manifestações cardíacas compatíveis sorologicamente com DCA em Tibu, Norte de Santander, entre 6 militares e a ingestão de carne de animais silvestres durante trabalhos na selva foi a justificativa da infecção. Nesse país, Carceres *et al.* (1999) detectaram 3 óbitos com síndrome cardíaca, num grupo de 13 pessoas no Departamento de Magdalena, confirmados sorológica e histologicamente. Na ausência de triatomíneos nas investigações epidemiológicas efetuadas, especulou-se a possibilidade

da infecção por via oral pelo consumo de vinho de palma regional. Na Venezuela foi detectado um surto com 103 casos sendo 44 confirmados parasitologicamente em uma escola na periferia de Caracas. Posteriormente no estudo sorológico realizado pelo menos 1000 pessoas expostas. Todos os pacientes apresentavam sintomas agudos clássicos como febre prolongada com calafrios, cefaleia, mialgias, artralguas, arritmias, edema generalizado, eritema cutâneo, hepatomegalia e sintomas neurológicos (Promed News, 2007; Miles, 2010, De Noya *et al.*, 2010).

No Brasil, fora da Amazônia, de acordo com levantamento histórico da doença de Chagas associada à via oral realizado por Valente S *et al.*, 2011 – dados não publicados), podem ser contabilizados apenas 7 surtos, com um total de 112 casos agudos, entre 1965 a 2006 (Tabela 1). O primeiro surto foi registrado em Teutônia (RS), com 17 pessoas (6 óbitos) com fase aguda confirmada por sorologia e xenodiagnóstico, além de autópsia. Suspeitou-se, sem confirmação, que a ingestão de alimento servido numa escola local seria a causa da infecção (Silva N *et al.*, 1968). O segundo surto ocorreu na localidade de Riacho de Santana (BA), com um total de 20 casos registrados por Barrett *et al.* (1980) sem precisar os alimentos que estariam envolvidos. Outro surto de DCA ocorreu em 1986, em Catolé do Rocha na Paraíba, acometendo um grupo de 26 pessoas, um óbito foi confirmado por autópsia e os demais pacientes apresentaram sorologia, xenodiagnóstico e hemocultura positivos. Sugeriu-se que a ingestão de caldo-de-cana contaminado com *T. cruzi* seria a responsável pela infecção (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991). Os isolados foram identificados com da linhagem TCI típica do ciclo silvestre do *T. cruzi* (Teixeira *et al.*, 2006a).

Um surto de doença de Chagas aguda foi detectado em Santa Catarina em 2005, com 24 pessoas confirmadas por diagnóstico laboratorial. Cinco pacientes evoluíram para óbito. Os pacientes detectados relataram consumo de caldo de cana e foi associada à participação de triatomíneos carregados com os feixes de cana para as máquinas de extrair o suco. Os isolados de *T. cruzi* desses pacientes foram genotipados como TCII (Steindel *et al.*, 2008). Recentemente, três surtos Brasil, (2009) foram descritos fora da Amazônia: um surto em Redenção (CE) com oito casos agudos, e dois surtos na Bahia, um no município de Ibipitanga com 6 casos e outro em Macaúbas. Nesse último surto, Dias *et al.* (2008) concluíram que a transmissão estaria associada com a ingestão de água contaminada com fezes de triatomíneos. Em 2009 um surto no município de Axixá do Tocantins (TO) foi relatado em quatro pessoas de um grupo familiar sem a presença de triatomíneos no domicílio, a hipótese de transmissão ficou em suspeição do consumo de palmitos extraídos e de uma palmeira regional (Oliveira *et al.*, 2011).

Tabela 1. Surtos de doença de Chagas fora da Amazônia Brasileira, 1967-2008¹

UF	MUNICÍPIO	ANO	Nº. CASOS	REFERÊNCIA
RS	Teutônia	1967	17	Coura, 1966
BA	Riacho de Santana	1979	20	Barrett <i>et al.</i> , 1979
PB	Catolé do Rocha	1991	26	Shikanay-Yasuda <i>et al.</i> , 1991
SC	Navegantes	2005	24	Steindel <i>et al.</i> , 2008
CE	Redenção	2006	8	Relato SVS no site: http://www.saude.ce.gov.br/internet/publicacoes/notastecnicas/nota_tecnica_chagas.pdf
BA	Macaúbas	2006	7	Relato SVS - Dias <i>et al.</i> , (2008b)
BA	Ibipitanga	2006	6	Relato SVS
TO	Axixá do Tocantins	2009	4	Relato SVS - (Oliveira <i>et al.</i> 2011).
TOTAL			112	

¹Fonte: Ministério da Saúde, Brasil, Instituto Evandro Chagas 2011.

1.3. SURTOS DE DOENÇA DE CHAGAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

O primeiro surto de doença de Chagas aguda (DCA) na Amazônia e o segundo surto do Brasil, foi descrito em Belém (PA), acometendo 4 pessoas de uma mesma família e domicílio. Nas investigações realizadas sugeriu-se a transmissão por alimento contaminado com fezes de triatomíneos silvestres (Shaw *et al.*, 1969). A hipótese de transmissão oral foi posteriormente demonstrada experimentalmente (Lainson *et al.*, 1980).

Após a descrição deste primeiro surto ocorrido em Belém (PA), novos surtos regionais só foram relatados quase vinte anos depois. Porém, diversos casos não publicados podem ser compilados e representados na série histórica apresentada na figura 3, tabela 2. Um surto com 3 casos de DCA foi registrado em 1982 no bairro da Pedreira em Belém, caracterizado sorológica e parasitologicamente, com um paciente tendo evoluído para óbito. Outros surtos ocorreram no Pará, 3 casos em Belém (1983) e 5 casos em Cametá (1988). Os pacientes diagnosticados nesses surtos, que nunca se ausentaram do Estado, nem haviam sido submetidos à transfusão de sangue, exibiam quadro típico de DCA com sintomas gerais e febre de 45 dias (Instituto Evandro Chagas, dados não publicados).

Rodrigues *et al.* (1988) descreveram dois surtos, um com seis e outro com dois casos agudos simultâneos, ocorridos em Macapá (AP). Os pacientes apresentaram febre prolongada, edema de membros inferiores e mal estar geral. Os casos foram caracterizados sorologicamente, com detecção de IgM, e parasitologicamente (2 pacientes). Os autores suspeitaram da transmissão oral e/ou vetorial. Entre 1989 e 1993, 3 surtos ocorreram em Belém: no bairro da Pedreira com 3 casos (Souza *et al.* 1989); no distrito de Icoaraci com 4 pessoas de uma mesma família (Crescente *et al.* 1992) e no município de Afuá com 4 casos (Valente S *et al.*, 1993). Os pacientes apresentaram exames

sorológicos e parasitológicos positivos e sintomas como febre de mais de 40 dias, eritema cutâneo, edema generalizado, miocardiopatia e cefaleia. Investigações realizadas no local, detectaram a presença de vetores (*R. pictipes*, *R. robustus* e *P. geniculatus*) e reservatórios silvestres (*D. marsupialis* e *P. opossum*) infectados com *T. cruzi* muito próximos aos domicílios das pessoas infectadas. Apesar do relato dos pacientes informando o encontro eventual destes triatomíneos nos domicílios, os investigadores não conseguiram concluir como a infecção ocorreu.

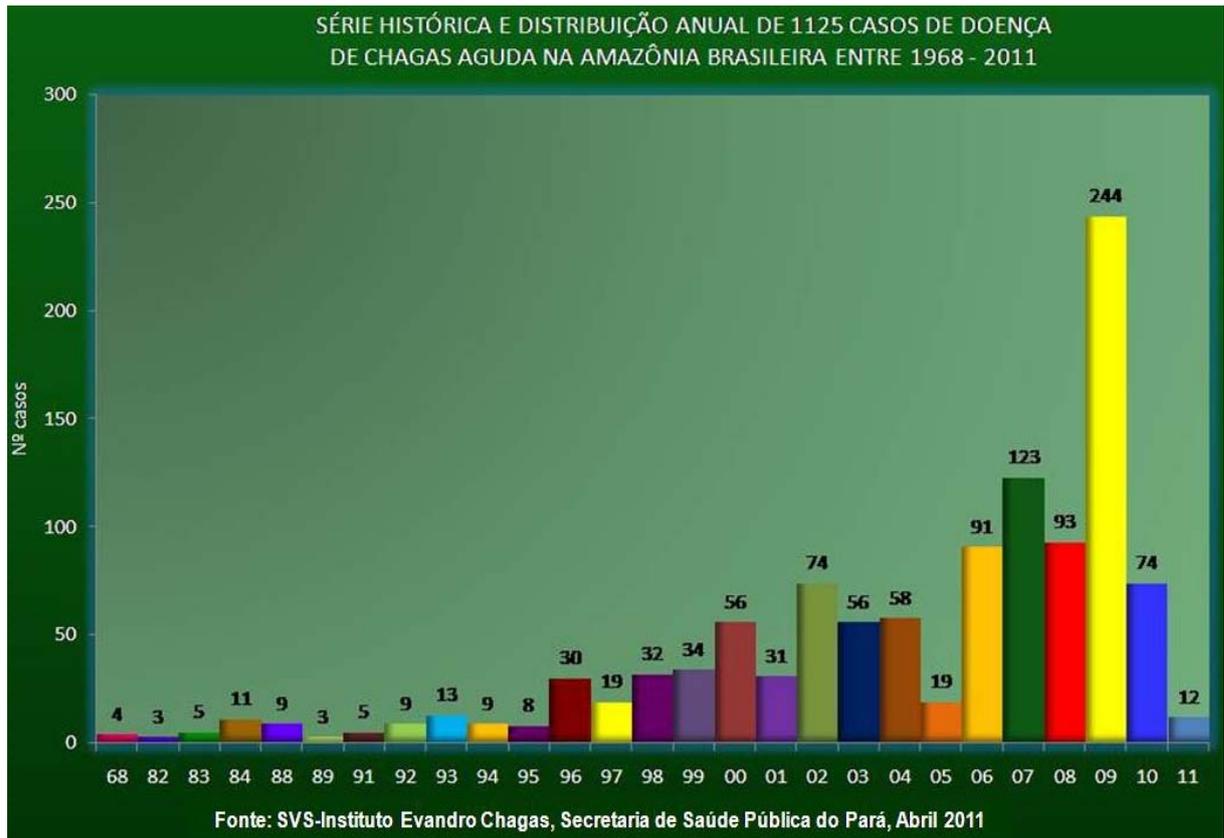


Figura 3. Série histórica da DCA na Amazônia Brasileira, 1968 a 2011

Em Rio Branco (AC), Viana *et al.* (1994) relataram DCA entre 3 irmãos que exibiam febre alta, edema generalizado, miocardiopatia e evolução rápida para óbito de um menor. Os autores não conseguiram definir a forma de transmissão, mesmo encontrando no peridomicílio triatomíneos silvestres infectados com *T. cruzi*. Segundo a mãe, era hábito das crianças a ingestão de frutos de urucuri, palmeira *Attalea phalerata* existente no quintal da casa na qual foram coletados 48 triatomíneos (*R. pictipes*) infectados com *T. cruzi*. A hipótese de infecção foi que as crianças tenham ingerido frutos contaminados com fezes dos triatomíneos.

Valente S *et al.* (1997a) descreveram no Pará um surto em Viseu e outro em Belém, com 2 e 4 casos de DCA respectivamente, todos autóctones e sem relação de transmissão vetorial ou transfusional. Em Viseu foram coletadas colônias de *R. pictipes* infectados com *T. cruzi* em palmeiras

de inajá (*Maximiliana regia*). Os pacientes eram jovens com quadro febril prolongado e edema generalizado. Um surto de DCA com 17 pessoas infectadas foi registrado no município de Mazagão, Estado do Amapá. Triatomíneos silvestres, *R. pictipes* e *R. robustus* presentes nas cercanias, foram atraídos pela luz, caíram na máquina de extrair o suco de açaí, e as pessoas se infectaram com a ingestão desse suco (Valente S *et al.*, 1997b; 2009). O envolvimento do açaí na transmissão oral de casos de DCA tem sido associado com novos surtos entre os anos de 1998 e 2001 no Pará (Belém, Abaetetuba, Bagre e Cametá) e Amapá (Santana) com um total de 21 casos com sintomas que variaram de febre à insuficiência cardíaca, com registro de dois óbitos. No município de Abaetetuba, foi encontrado um *P. geniculatus* infectado com tripanossomas indistinguíveis de *T. cruzi* em uma embarcação que transportava frutos de açaí procedentes de ilhas da Região.

Em todos estes surtos, a sintomatologia clínica compatível e os exames parasitológicos e sorológicos positivos para *T. cruzi* confirmaram os casos de DCA. As investigações epidemiológicas afastaram as possibilidades de transmissão vetorial ou transfusional, e foi proposta a ingestão de açaí na transmissão (Valente V *et al.*, 1998a; Valente S *et al.*, 1999b, 2000; Pinto A *et al.*, 1999; Pantoja *et al.*, 2000). Dois surtos foram registrados em Santarém, o primeiro com 13 casos foi descrito por Valente S *et al.* (2001) e a transmissão associada com a ingestão de suco de bacaba preparado de maneira idêntica ao açaí. Um novo surto, em 2006, na localidade de Mojuí dos Campos, envolveu 21 pessoas, novamente os autores sugerem a participação do suco da bacaba na transmissão (Crespo *et al.*, 2007).

Em 2000, foram detectados 13 casos no Amapá (7 em Macapá e 6 em Santana) e 17 no Pará, todos em bairros centrais de Belém sem nenhuma associação vetorial, todos relacionados com a contaminação pela via oral e novamente associados ao de açaí contaminado (Valente S *et al.*, 2001; Valente V *et al.*, 2002).

Na macrorregião do Marajó, entre 2001 e 2002, foram registrados 10 casos de DCA, sendo que cinco ocorreram isoladamente e não foram caracterizados como surtos. No município de Ponta de Pedras ocorreu um surto com 5 casos e na localidade foi realizado um amplo trabalho sorológico e epidemiológico. Todos os pacientes apresentaram quadro agudo de febre prolongada, cefaleia, edema de membros inferiores, calafrios e eritema cutâneo de manifestação variável (Valente V *et al.*, 2002). Nesse local, foram dissecadas 17 palmeiras do gênero *Orbignya* e, pelo menos, 60% delas estavam infestadas de triatomíneos silvestres, *R. robustus*, *R. pictipes* e *P. geniculatus*. De 86 insetos coletados, 27 apresentaram *T. cruzi* nas fezes. Dos animais silvestres coletados, num total de 15 animais (5 *Didelphis marsupialis*, 4 *Marmosa cinerea*, 4 *Proechimys guyanensis* e 2 *Marmosa murina*), 5 (33,3%) apresentaram infecção por *T. cruzi*.

Tabela 2. Surtos de doença de Chagas na Amazônia Brasileira de 1968 a 2011¹

UF	MUNICÍPIO	ANO	Nº. DE SURTOS	Nº. DE CASOS/SURTO
AC	AC - Rio Branco	1993	02	03
	Feijó	2010	01	06
AP	Macapá	1974-2009	15	76
	Mazagão	1996	01	17
	Santana	1999-2010	06	42
AM	Tefé	2004	01	09
	Coari	2007	01	25
PA	Abaetetuba	1998-2010	19	149
	Afuá	1992-2010	03	13
	Ananindeua	2003-2010	09	38
	Bagre	1999	02	16
	Barcarena	2002-2010	08	29
	Belém	1968-2010	48	184
	Capanema	2009	1	2
	Castanhal	2009	02	14
	Currálinho	2009	02	22
	Breves	2003-2010	06	58
	C. do Arari	1992-2006	02	16
	Cametá	1988-2010	4	14
	Igarapé-miri	2002	01	16
	Pa - muaná	2004	01	04
	Ponta de Pedras	2001-2010	03	18
	Portel	2009	03	18
	Santarém	1999-2006	02	31
	S. J. de Pirabas	2003	01	03
	S. S. Boa Vista	2004-2010	03	15
	Vizeu	1996	01	03
MA	São Luís	1985	01	02
	Bacurituba	1985	01	02
TOTAL			149	845

¹Fonte: Instituto Evandro Chagas, 2011. Citados parcialmente em Valente *et al.*, (1999 a,b, 2006;2009); Pinto *et al.*, (2004; 2008).

Em 2004, um surto no município de Tefé, o primeiro do Estado do Amazonas, acometeu 9 pessoas com febre intensa, edema de membros inferiores e do rosto sendo que um dos pacientes apresentou um quadro de meningoencefalite. Especulou-se a transmissão pela via oral, embora sem que se definisse o tipo de alimento ingerido (Borborema *et al.*, 2005; Lacerda *et al.*, 2005).

O período entre 2003 a 2006 elevou-se o registro do número de surtos de DCA detectados nos Estados do Pará e Amapá. Estes casos se concentravam especialmente no nordeste e oeste do Pará e a bacia do Marajó, além do sudeste do Estado do Amapá (Figura 4) e foi justificado pela melhoria no diagnóstico e no sistema de vigilância e notificação de casos, produto de parceria entre as Secretarias de Saúde, a Secretaria de Vigilância em Saúde e o Instituto Evandro Chagas (Brasil, 2005).

Um Programa Estadual para Controle da doença de Chagas no Pará (PDCH-PA) foi estabelecido em 2006 com objetivo implantar medidas para estruturação do PDCH-PA e visavam ações como: estratégias de vigilância epidemiológica nas ações básicas de saúde; notificação de casos; capacitação de pessoal; referências para diagnóstico laboratorial e tratamento; investigação epidemiológica dos casos e/ou surtos; apoio às instituições de pesquisas nas investigações e de reservatórios e vetores do *T. cruzi*; ações de vigilância sanitária de possíveis alimentos envolvidos na transmissão de casos de DCA.

Dos objetivos do PDCH-PA, as ações de vigilância sanitária dos alimentos envolvidos na transmissão de casos de DCA, seriam aquelas que permitiriam interromper a transmissão dos casos e surtos envolvendo o principal alimento associado: o açaí. Durante os anos de ações, o PDCH-PA e seus parceiros (SMSs, ONGs, Escolas, Instituições de Pesquisa e Agentes de Vigilância Sanitária) empreenderam junto aos agentes de saúde e população em geral palestras, seminários, aulas, distribuição de folderes e cartilhas com informações sobre DC no sentido de alertar sobre a transmissão da doença por alimentos. Estes instrumentos de informações, entretanto, não conseguiram interromper a transmissão dos casos de origem alimentar; ao contrário, com uma vigilância e notificação mais eficientes os registros oficiais tiveram um importante incremento nos últimos três anos.

Com a adoção deste PDCH-PA, entre os anos de 2006 a 2011 foram registrados somente no Estado do Pará, 634 casos agudos de DCA (com 12 óbitos reconhecidos) distribuídos em 53 municípios. Somente em Belém e Abaetetuba, somaram respectivamente, 133 casos (6 surtos) e 106 casos (5 surtos). Esta explosão de casos de DCA coincidiu com uma iniciativa governamental de fomento ao agronegócio e que incentivou pequenos e médios agricultores no plantio de novos açaizais em 86 municípios do nordeste do Estado do Pará. As campanhas de treinamento e vigilância sanitária deste programa têm caminhado razoavelmente nas maiores cidades do estado, mas é lenta, ou mesmo ausente, fora dos grandes centros urbanos e os casos de DCA continuam acontecendo.

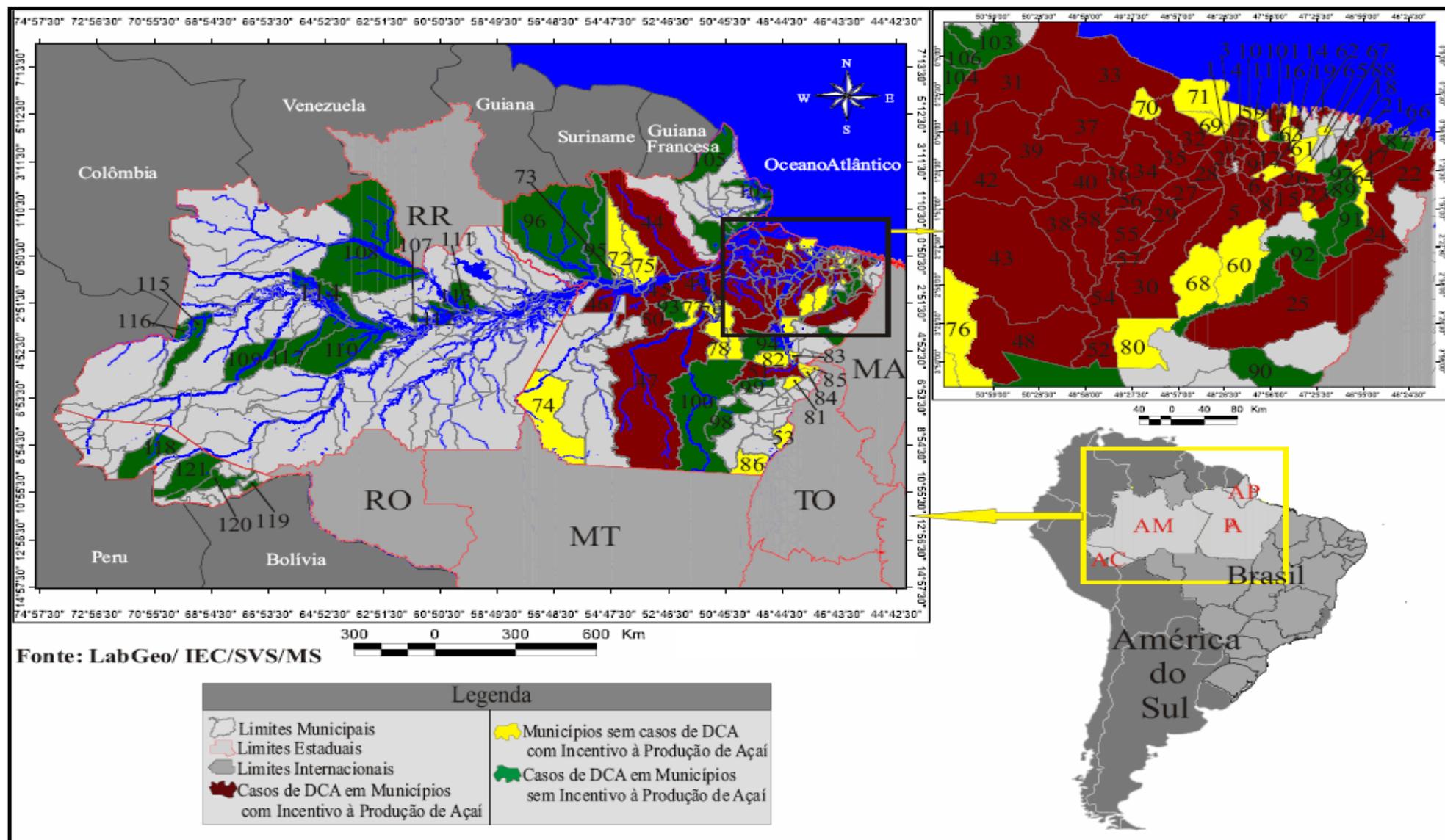


Figura 4. Distribuição da doença de Chagas aguda nos Estados do Pará, Amapá, Amazonas e Acre, 1968 – 2011*

***Quadro 1.** Municípios dos Estados do Pará, Amapá, Amazonas e Acre com registro de casos de doença de Chagas aguda, 1968 - 2011.

1. Ananindeua (PA)	32. Cachoeira do Arari (PA)	63. Marapanim (PA)	94. Ipixuna do Para (PA)
2. Belém (PA)	33. Chaves (PA)	64. S. Luzia do Para (PA)	95. Medicilândia (PA)
3. Benevides (PA)	34. Muaná (PA)	65. Santarém Novo (PA)	96. Novo Repartimento (PA)
4. S. Bárbara do Pará (PA)	35. Ponta de Pedras (PA)	66. Mãe do Rio (PA)	97. Óbidos (PA)
5. Acará (PA)	36. S. S. da Boa Vista (PA)	67. S. M. do Pará (PA)	98. Oriximiná (PA)
6. Bujaru (PA)	37. Anajás (PA)	68. Tailândia (PA)	99. Ourém (PA)
7. Colares (PA)	38. Bagre (PA)	69. Salvaterra (PA)	100. Ourilândia do Norte (PA)
8. Concórdia do Para (PA)	39. Breves (PA)	70. S. Cruz do Arari (PA)	101. Parauapebas (PA)
9. S. Isabel do Para (PA)	40. Curralinho (PA)	71. Soure (PA)	102. Amapá (AP)
10. S. Antonio do Tauá (PA)	41. Gurupá (PA)	72. Alenquer (PA)	103. Macapá (AP)
11. Vigia (PA)	42. Melgaço (PA)	73. Curuá (PA)	104. Mazagão (AP)
12. Castanhal (PA)	43. Portel (PA)	74. Jacareacanga (PA)	105. Oiapoque (AP)
13. Gurupá (PA)	44. Almeirim (PA)	75. Monte Alegre (PA)	106. Santana (AP)
14. Magalhães Barata (PA)	45. Prainha (PA)	76. Anapu (PA)	107. Anama (AM)
15. S. Dom. Capim	46. Santarém (PA)	77. Brasil Novo (PA)	108. Barcelos (AM)
16. S. Fco. do Pará (PA)	47. Altamira (PA)	78. Sem. J. Porfírio (PA)	109. Caruari (AM)
17. Bragança (PA)	48. Pacajá (PA)	79. Vitória do Xingu (PA)	110. Coari (AM)
18. Capanema (PA)	49. Porto de Móz (PA)	80. Breu Branco (PA)	111. Iranduba (AM)
19. Salinópolis (PA)	50. Uruará (PA)	81. Eldorado dos Carajás (PA)	112. Manacapuru (AM)
20. S.J. de Pirabas (PA)	51. Marabá (PA)	82. Itupiranga (PA)	113. Manaus (AM)
21. Tracuateua (PA)	52. Tucuruí (PA)	83. Nova Ipixuna (PA)	114. Marã
22. Viseu (PA)	53. Conceição do Araguaia (PA)	84. S. D. do Araguaia (PA)	115. S. P. de Olivença
23. Irituia (PA)	54. Baião (PA)	85. S. J. do Araguaia (PA)	116. Tabatinga (AM)
24. N. Esperança Piriá (PA)	55. Cametá (PA)	86. Santana do Araguaia (PA)	117. Tefé (AM)
25. Paragominas (PA)	56. Limoeiro do Ajuru (PA)	87. S. F. do Xingu (PA)	118. Feijó (AC)
26. S. Miguel do Guamá (PA)	57. Mocajuba (PA)	88. Terra Alta (PA)	119. Plácido de Castro (AC)
27. Abaetetuba (PA)	58. Oeiras do Pará (PA)	89. Augusto Correa (PA)	120. Rio Branco (AC)
28. Barcarena (PA)	59. S. Caetano de Odivelas (PA)	90. Bonito (PA)	121. Sena Madureira (AC)
29. Igarape-Miri (PA)	60. Tome Açu (PA)	91. Capitão Poço (PA)	
30. Moju (PA)	61. Igarapé Açu (PA)	92. Dom Eliseu (PA)	
31. Afuá (PA)	62. Inhangapi (PA)	93. Garrafão do Norte (PA)	

1.4. DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *T. CRUZI*

A espécie *T. cruzi* é constituída por uma variedade de populações que circulam em mamíferos silvestres e domésticos, além do homem, transmitidos por diversas espécies de triatomíneos que habitam diferentes ecótopos. Esta variabilidade confere ao *T. cruzi* distintos padrões biológicos em vertebrados e triatomíneos, patológicos (virulência, mortalidade, invasividade tissular), clínicos (manifestações cardíacas e digestiva com presença ou não das megassíndromes), imunológicas, bioquímicas e moleculares (Miles *et al.*, 2003; Buscaglia & Di Noia, 2003; Devera *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2006; Coura *et al.*, 2007; Miles *et al.*, 2009).

Inicialmente o perfil de características morfológicas permitiu agrupar os isolados de *T. cruzi* em biodemas avaliando-se a virulência, mortalidade e tropismo de isolados inoculados em camundongos. Isolados de *T. cruzi* da Amazônia induzem, em geral, baixas parasitemia e mortalidade nas fases aguda e crônica (Andrade *et al.*, 1974; Devera *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2008). Entretanto, um único isolado do Acre analisado por esses parâmetros, aparentemente de um caso autóctone, se mostrou virulento e letal para camundongo (Barata *et al.*, 1988).

Isolados de *T. cruzi* de diferentes hospedeiros e regiões geográficas são, atualmente, distribuídos em seis linhagens ou DTUs I-VI (Zingales *et al.*, 2009). As análises iniciais de polimorfismo de *T. cruzi* baseada em isoenzimas revelaram 3 grupos que foram denominados zimodemas Z1, Z2 e Z3 (Miles *et al.*, 1977; 1978, 2009; Tibayrenc *et al.*, 1995). Posteriormente, estes grupos foram redefinidos com marcadores dos genes ribossômicos e de mini-exon (ou *spliced leader*) que revelaram duas linhagens principais: *T. cruzi* I (TCI) e *T. cruzi* II (TCII), que correspondem aos zimodemas Z1 e Z2, respectivamente, revelando também a presença de linhagens híbridas (Souto *et al.* 1996; Zingales *et al.*, 1998; Anônimo, 1999). Esta metodologia permitiu ainda separar *T. cruzi* de isolados de *T. rangeli* (Fernandes *et al.*, 2001). A linhagem Z3 (Miles *et al.* 1977; 1978) não foi agrupada nas duas linhagens estabelecidas, mas foi posteriormente definida por marcadores do gene de mini-exon (Fernandes *et al.* 1998) e subdividida em dois subgrupos, Z3A e Z3B, baseado em polimorfismo de ITSrDNA (Santos *et al.*, 2002; Mendonça *et al.*, 2002). Os subgrupos Z3A e Z3B foram definidos como linhagens TCIIc e TCIIa e correspondem atualmente as DTUS III e IV (Zingales *et al.*, 2009).

A utilização dos gene de mini-exon para distinguir genotipicamente tripanossomatídeos veio trazer avanços no conhecimento das linhagens de *T. cruzi*. Segundo Agabian (1990) os genes de mini-exon também conhecidos como *spliced leader* (SL), participam do processo pós-traducional chamado *trans-splicing*, que resulta na adição de sequências de 39 nucleotídeos, denominadas "*spliced-leader*" ou mini-exon, na extremidade 5' de todos os mRNAs maduros dos Kinetoplastida.

Sua organização composta por regiões com distintos graus de conservação, os genes SL têm utilidade taxonômica e de diagnóstico. Cada unidade de repetição do gene SL pode ser dividida em 3 partes: um *exon* altamente conservado de 39 nucleotídeos; um *intron* de 50-100 nucleotídeos moderadamente conservado, e uma região intergênica espaçadora que apresenta variações de tamanho e de sequência entre espécies de tripanossomatídeos e linhagens de tripanossomas (Figura 5). Existem cerca de 200 cópias do gene SL repetidas *in tandem* no genoma dos tripanossomatídeos que são, assim, um bom alvo para diagnóstico (Agabian, 1990; Donelson & Zeng, 1990; Davis, 1996).



Figura 5. Diagrama representativo da unidade repetitiva do gene de mini-exon ou Spliced Leader

Análise das sequências do gene SL de inúmeros tripanossomatídeos apresentou regiões com distintos graus de conservação entre gêneros e espécies. Porém, essas sequências são úteis somente para inferir graus de relacionamento genético entre espécies muito relacionadas, para análise de variabilidade genética e como alvo para diagnóstico de tripanossomatídeos, uma vez que são muito variáveis para permitir alinhamentos confiáveis entre organismos de espécies distintas (Fernandes *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 1999b,c; Gibson *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2001; Maia da Silva *et al.*, 2007).

Sequências do gene SL vêm sendo utilizadas na identificação de distintos gêneros da família Trypanosomatidae. A heterogeneidade de sequências de *introns* e regiões intergênicas tem sido útil também na caracterização de espécies de *Leishmania* (Hassan *et al.* 1993; Fernandes *et al.* 1994; Harris *et al.* 1998), *Endotrypanum* (Fernandes *et al.*, 1993) *Crithidia* (Fernandes *et al.* 1997) e *Phytomonas* (Teixeira *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 1999a,b). Estas sequências permitem também a identificação de tripanossomas africanos (Sturm *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 2001) e linhagens de *T. rangeli* (Maia da Silva *et al.*, 2007).

Posteriormente, estudos baseados em RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA - (Brisse *et al.* 2000a,b), sequências de SSU rRNA (Brisse *et al.* 2001) e um grande número de *loci* para isoenzimas (Breniere *et al.* 2003) estabeleceram 5 linhagens (TCIIa-e): TCIIb e TCIIe no ciclo doméstico na Argentina, Bolívia, Brasil e Chile; TCIIc no ciclo doméstico do Chile e Bolívia; TCIIa no ciclo silvestre da Amazônia e TCIIc, ciclos silvestres da Amazônia, Nordeste e Sul do Brasil, Argentina e Paraguai (Barrett *et al.* 1980; Miles *et al.* 1981a; Póvoa *et al.* 1984; Gaunt & Miles, 2000; Yeo *et al.* 2005; Fernandes *et al.* 1998, 1999a,b; Zingales *et al.* 1999; Freitas *et al.* 2006; Ceballos *et al.* 2006;

Toma *et al.* 2007; Cardinal *et al.* 2008; Aleixo *et al.* 2008; Marcili *et al.* 2009a,b; Miles *et al.* 2009). Machado & Ayala, 2001; Llewellyn *et al.* 2009a,b) e diversos genes não nomeados, foram avaliados (Sturm *et al.*, 2003; Brisse *et al.*, 2003; Westenberger *et al.*, 2005, 2006). Análises de microssatélites e do gene citocromo oxidase II indicaram que TCIIc deve ser a terceira linhagem (TCIII) ancestral que participa da geração de híbridos (Freitas *et al.*, 2006). Essa linhagem foi descrita em amostras do ciclo silvestre da Amazônia Brasileira associada a ecótopos terrestres, mamíferos *Dasyopus novencinctus*, *Monodelphis* e triatomíneos da espécie *P. geniculatus* (Miles *et al.*, 2009).

A linhagem TcI, circula nos ambientes silvestre e doméstico com ampla distribuição geográfica, no Sul dos USA, México e em todos os países das Américas Central e do Sul (Miles *et al.*, 2003). Até então, não foi proposta a subdivisão dessa linhagem, apesar de estudos recentes terem revelado grande polimorfismo de isolados TcI de diferentes regiões, ciclos de transmissão e hospedeiros vertebrados e triatomíneos (Salazar *et al.*, 2006; O'Connor *et al.*, 2007; Herrera C *et al.*, 2007; Llewellyn *et al.*, 2009a; Miles *et al.*, 2009).

Com marcadores de ITS-RFLP e RAPD Luna-Marín *et al.* (2009) caracterizaram amostras de TC1 isoladas do ciclo doméstico no Departamento de Santander, Colômbia que apresentaram elevado polimorfismos e variabilidade, supondo que populações de Tc1 neste ciclo são heterogêneas e compostas de diferentes clones. Por outro lado, Lala *et al.* (2009) observaram padrões distintos de diversidade biológica e genética entre amostras isoladas do homem, animais silvestres e triatomíneos oriundos do estado do Paraná, Brasil quando submetidos a inoculação em animais experimentais e a ação do benzonidazol.

A associação das diferentes formas clínicas e da mortalidade da doença de Chagas com origem geográfica é bem conhecida. Miles *et al.* (1981a) especulavam se amostras isoladas de *T. cruzi* no Brasil e na Venezuela eram muito diferentes, e que formas clínicas poderiam desenvolver. A maioria dos isolados de pacientes com manifestações severas (miocardites e megassíndromes) pertence à linhagem TCII, proveniente de áreas endêmicas do Cone Sul (Chile, Argentina, Bolívia, Brasil - exceto Amazônia), e transmitida por triatomíneos domiciliados, principalmente *T. infestans* (Baptista *et al.*, 2006; Manoel-Caetano & Silva, 2007, Manoel-Caetano, *et al.*, 2008; D'Avila *et al.*, 2009).

A linhagem TcI apresenta baixa prevalência nos casos humanos de doença de Chagas nos países do Cone Sul, e predominante no México, Panamá, Colômbia e Venezuela. A maioria destes países também mantém esta linhagem no ciclo silvestre no México (Bosseno *et al.* 2009) e Guatemala (Pennington *et al.* 2009) com ocorrência de casos humanos ligados à esta linhagem. Casos graves de doença de Chagas, apesar da ausência de megassíndromes, são comuns nesses países com isolados de TcI (Añez *et al.* 2004, Sanches-Guillen *et al.* 2006; Mejía-Jaramillo *et al.* 2009 a,b), assim como na Colômbia e Equador, onde predominam TcI e Z3 (Garzón *et al.* 2002; Monroy *et al.*, 2003; Mantilla *et*

al., 2010). Pelo menos um caso crônico grave de infecção por TCI, provavelmente uma infecção oral, foi confirmado em paciente do nordeste do Brasil (Teixeira *et al.*, 2006). *R. prolixus* é o vetor mais importante de TCI na Venezuela e Colômbia, habitando os ambientes silvestre e domiciliar, favorecendo assim à justaposição dos dois ciclos de transmissão (Miles *et al.*, 1981a,b; 2003). TCI também predomina no ambiente silvestre e nos casos humanos da Amazônia Brasileira, onde é transmitido por diversas espécies do gênero *Rhodnius* (Valente S *et al.*, 2009, Marcili *et al.*, 2009 a,b).

Por outro lado, as linhagens TCIIc (TCIII) e TCIIa (TCIV), apesar de relatos de raros casos humanos no Pará, Amazonas e Minas Gerais (Miles *et al.* 1981a; Fernandes *et al.* 1999a; Freitas *et al.* 2006; Marcilli *et al.*, 2009a,b) são praticamente exclusivas do ciclo de transmissão silvestre. A antiga denominação de Z3 agrupando essas duas linhagens se deve a padrões indistinguíveis nas genotipagens baseadas no gene de mini-exon (Fernandes *et al.*, 1998, 2001; Lisboa *et al.*, 2004, 2008, Herrera *et al.*, 2007, Santos-Mallet *et al.*, 2008). Isolados humanos caracterizados como Z3 foram descritos na Região Amazônica (Aguilar *et al.* 2007). Valente S *et al.* (2009) encontraram Z3 entre os isolados de um surto ocorrido em Mazagão, Amapá, juntamente com TCI e *T. rangeli*.

Estudos baseados em novos marcadores que permitem separar TCIII de TCIV, evitando assim a classificação inadequada como Z3, confirmaram que a linhagem TCIII ocorre no Brasil, Argentina e Paraguai, infectando mamíferos terrestres, especialmente tatus (Barrett *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1981a; Pova *et al.*, 1984; Gaunt & Miles, 2000; Yeo *et al.*, 2005; Ceballos *et al.*, 2006; Llewellyn *et al.*, 2009b; Miles *et al.*, 2009). Essa linhagem tem sido encontrada em cães domésticos no Paraguai (Barnabé *et al.* 2001), Argentina (Cardinal *et al.* 2008) e Brasil (Umezawa *et al.*, 2009). Triatomíneos de hábitos domésticos e terrestres, como *T. infestans*, e de hábitos silvestres, *P. geniculatus* e *T. rubrovaria*, são as espécies descritas infectadas com TCIII (Martins *et al.*, (2008).

Não são claras as relações eco-epidemiológicas entre reservatórios, vetores e ecótopos no ciclo de transmissão da linhagem TCIIa (TcIV). Essa linhagem foi descrita em tatus e marsupiais do gênero *Monodelphis* caracterizados por zimodemas (Miles *et al.* 1981 a), mas não foram ratificados com marcadores moleculares. Isolados de *R. brethesi* e humanos da Amazônia Brasileira foram confirmados como Z3B = TCIV (Mendonça *et al.*, 2002). Diversos estudos detectaram TCIIa em cães domésticos e guaxinins na América do Norte (USA) (Barnabé *et al.*, 2001; Roellig *et al.*, 2009).

Diferentes hipóteses baseadas em inferências filogenéticas foram formuladas a fim de explicar a evolução intra-específica de *T. cruzi*. De acordo com os ecótopos dos triatomíneos e na associação destes com determinados mamíferos foi proposta a seguinte história evolutiva para as linhagens de *T. cruzi* (Gaunt & Miles 2000; Yeo *et al.*, 2005; Miles *et al.*, 2009): TCI está associado com marsupiais (gênero *Didelphis*) e triatomíneos (gênero *Rhodnius*) de ecótopos arbóreos, enquanto as linhagens TCII

e Z3 estão associadas com triatomíneos dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* (que habitam buracos e fendas de rochas) e vertebrados de hábitos terrestres (tatus e *Monodelphis*).

1.4.1. Linhagens de *T. cruzi* e associação com formas clínicas da doença de Chagas na Amazônia

Na Amazônia Brasileira, onde apenas TcI e Z3 foram detectados casos em humanos (Miles *et al.* 1986; Fernandes *et al.* 2001; Coura *et al.* 2002a; Junqueira *et al.* 2005; Valente S *et al.* 2009), é significativa a prevalência de indivíduos sorologicamente positivos e assintomáticos (Coura *et al.*, 2002b; Pinto A *et al.*, 2009). Apesar do pequeno número de casos crônicos estudados, baixa morbimortalidade da doença de Chagas tem sido observada na Amazônia quando comparada com o Cone Sul (Coura *et al.*, 2002a; Miles *et al.*, 2003). Recentemente, foram descritos casos autóctones no Estado do Amazonas com cardiopatia chagásica crônica (Vinas Albajar *et al.*, 2003; Xavier *et al.*, 2006).

Entretanto, os casos agudos de doença de Chagas estudados na Amazônia Brasileira diferiram bastante, com quadros clínicos típicos de exuberância sintomática aguda, mas de prognóstico benigno, (Rodrigues *et al.* 1988; Fraiha Neto *et al.* 1995; Valente S *et al.* 2000, Pinto A *et al.* 2001), ou incluindo casos graves com evolução para morte como referidos em estudos de Pinto A *et al.* (2004) quando foram descritos nos municípios de Abaetetuba, Cametá e Igarapé Miri (PA), 4 casos de comprometimento cardíaco grave de doença de Chagas aguda com exame parasitológico positivo para *T. cruzi*, cujos pacientes apresentavam febre súbita, mialgia, dispnéia e sinais de parada cardíaca. Apesar do tratamento, três pacientes evoluíram rapidamente para óbito. Foi sugerida a realização de estudos mais detalhados a fim de se identificar o perfil genético dos isolados circulantes na Região e, assim, uma associação com a gravidade dos casos que se apresentaram.

A idéia equivocada de que a doença de Chagas é benigna na Amazônia pode influenciar nas condutas de prevenção e tratamento nas Regiões onde predominam TcI e Z3 haja vista o registro de casos graves de abdômen agudo com intenso quadro hemorrágico (Pinto A *et al.* 2001) e com síndrome cardíacas severas (Pinto A *et al.* 2004) evoluíram para óbito dos pacientes em poucos dias.

Em estudo mais abrangente realizados com Pinto A *et al.* (2009) foram descritos sintomas e sinais clínicos de 233 pacientes da Amazônia. Os sinais mais comuns nos pacientes com DCA foram febre (100%), cefaléia (92,3%), mialgia (84,1%), palidez (67%), dispnéia (58,4%), edema de membros inferiores (57,9%), edema de face (57,5%) dor abdominal (44,2%), miocardite (39,9%) e exantema (27%). O eletrocardiograma mostrou alterações de repolarização ventricular em 38,5% dos casos, baixa voltagem de QRS em 15,4% e desvio de SAQRS em 11,5%, extra-sístoles ventriculares em 5,8%, bradicardia em 5,8% e taquicardia em 5,8%, bloqueio de ramo direito em 4,8% e fibrilação atrial

em 4,8%. No ecocardiograma a alteração mais importante foi o derrame pericárdico em 46,2% dos casos. Treze (5,6%) pacientes evoluíram para o óbito, 10 (76,9%) dos quais por comprometimento cardiovascular, dois por complicações de origem digestiva e um de causa mal definida.

Com o aumento de casos de infecção humana diagnosticada com TCI e Z3 na Amazônia brasileira, novas abordagens clínicas devem ser adotadas para monitoramento dos pacientes que permitam verificar a severidade ou não dos sintomas.

2. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas na Região Amazônica é considerada atualmente motivo de crescente preocupação nos últimos anos. A infecção por *T. cruzi* do homem, animais silvestres e triatomíneos tem sido descrita em todos os países da bacia amazônica, onde ocorre com alta prevalência e ampla dispersão como enzootia silvestre (Dias *et al.*, 2002a,b; 2007; Coura *et al.*, 2002a,b, 2007, Aguilar *et al.*, 2007, Marcili *et al.*, 2009a, Miles *et al.*, 2009). Mais de 1.125 casos de doença de Chagas já foram descritos, principalmente de doença aguda na Amazônia Ocidental nos Estados do Para, Amapá, Amazonas e Acre (Instituto Evandro Chagas, 2011 – Dados não publicados). O aumento do número de casos na Região se deu devido à melhor vigilância, maior conhecimento dos sintomas da fase aguda, busca ativa de pacientes sintomáticos e inquéritos soro-epidemiológicos (Valente *et al.*, 2009; Pinto A *et al.* 2009, Beltrão *et al.*, 2009).

Os relatos recentes sobre doença de Chagas na Amazônia Brasileira têm servido de alerta à comunidade científica para o perigo de infecção oral e de domiciliação de triatomíneos silvestres em regiões que começam a ser povoadas. Além dos casos de infecção oral, diversos fatores tais como crescimento da população, introdução de novas atividades profissionais, desmatamento e drástica redução dos animais silvestres e de seus ecótopos podem levar à colonização de triatomíneos e a focos endêmicos da enfermidade na Região (Teixeira *et al.* 2001; Coura *et al.* 1990, 1999; 2002a,b; Miles *et al.* 2003; Rojas *et al.*, 2005; Barbosa, 2006, Brasil, 2009). Provavelmente, o número reduzido de indivíduos e de domicílios e a inexistência de vetores domiciliares têm impedido a domiciliação da doença (Abad-Franch *et al.*, 2010).

Apesar de evidências de crescente importância a doença de Chagas tem recebido pouca atenção, sendo ainda muito limitado o conhecimento dos vetores, ciclos biológicos, vias de transmissão, diversidade genética dos isolados, formas clínicas da doença, resposta ao tratamento e outras características que aparentam ser muito particulares na Amazônia. Embora seja uma enzootia, tanto em áreas colonizadas, como em áreas de floresta preservada, é inquestionável o aumento do número de casos da doença na região, com diversas evidências de elementos favoráveis a sua expansão e estabelecimento como endemia humana (Dias *et al.*, 2002a,b; Coura *et al.*, 2002a; Aguilar *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2009).

Enquanto o ciclo domiciliar foi bem estudado nas áreas endêmicas, pouco se conhece sobre a estrutura populacional e polimorfismo genético dos isolados de *T. cruzi* do ciclo silvestre. A relação preferencial de determinados genótipos de *T. cruzi* com os ciclos de transmissão antroponóticos ou silvestre, assim como associações de genótipos com espécies de mamíferos e de triatomíneos são aspectos muito interessantes da evolução de *T. cruzi* que podem ser investigados na Amazônia.

O estudo de um grande número de isolados representativos da extensa variabilidade ecogeográfica, de diversas espécies de mamíferos e vetores, e de pacientes com diferentes formas clínicas é indispensável para uma melhor compreensão da história evolutiva e do relacionamento do *T. cruzi* com seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. Embora ainda pouco estudado, especialmente na Região Amazônica, os trabalhos realizados apontam para uma grande complexidade do ciclo silvestre de *T. cruzi* (Jansen *et al.*, 1999; Fernandes *et al.*, 1999a,b; Pinho *et al.*, 2000; Lisboa *et al.*, 2006; Herrera L *et al.*, 2004; Herrera C *et al.*, 2007, Roque *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar estudos epidemiológicos dos ciclos de transmissão de linhagens de *T. cruzi* no Pará e Amapá, utilizando métodos parasitológicos, sorológicos e molecular na caracterização de isolados humanos, mamíferos e triatomíneos silvestres nos Estados do Pará e Amapá (com presença de de surtos de doença de Chagas) e na ilha de São Luís, Estado do Maranhão (com ausência de casos humanos).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diagnosticar casos de DCA ocorridos em surtos nos municípios de Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari, Estado do Pará, e Santana, Estado do Amapá;
- Avaliar a soroprevalência para anticorpos anti-*T. cruzi* nas comunidades associadas aos surtos e de comunidades sem casos de DCA, mas que mantém ciclo ativo de *T. cruzi* doméstico em São Luís, Maranhão;
- Realizar levantamentos de triatomíneos e mamíferos silvestres e/ou domésticos infectados e identificar a taxa de infecção para tripanossomas;
- Isolar *T. cruzi* de pacientes com sintomatologia compatível com DCA, de mamíferos e triatomíneos silvestres e/ou domésticos nas áreas selecionadas para estudo;
- Estudar o ciclo dos isolados de tripanossomatídeos em São Luís em ambiente doméstico e silvestre;
- Genotipar os isolados de tripanossomas obtidos em humanos, animais e triatomíneos;
- Caracterizar os ecótopos de triatomíneos e ciclos de transmissão analisando associações entre genótipos de tripanossomas e hospedeiros vertebrados e invertebrados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESCRIÇÃO DOS MUNICÍPIOS OU LOCALIDADES E DURAÇÃO DOS ESTUDOS

A base de coletas que norteou os estudos foi realizada nos municípios de Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari no Estado do Pará, em Santana no Estado do Amapá entre os anos de 2000 e 2007 (Figura 6) e em São Luís no Estado do Maranhão entre os anos de 1998 a 2005 (Figura 7).

4.1.1. Município de Barcarena – Pará

Os dados sobre o município de Barcarena foram coletados no site elaborado pelo Governo do Estado do Pará, (Pará, 2006).

4.1.1.1. Localização, população e economia

O município de Barcarena pertence à mesorregião Metropolitana de Belém e a microrregião de Belém com distância em linha reta de 30 km e acesso por via fluvial e rodoviária. Compreende área de 1.316,2 Km², e uma extensa faixa (Norte e Oeste) limitada pela Baía do Marajó. A sede municipal tem as seguintes coordenadas geográficas: 01° 30' 24 "de latitude Sul e 48° 37' 12" de longitude a Oeste de Greenwich. Os limites são: Ao Norte Baía de Guajará e Município de Belém, ao Sul Municípios de Moju e Abaetetuba, a Leste - Baía de Guajará e Município de Acará e a Oeste Baía do Marajó. A população em 2007 era de 102.015 habitantes. As principais atividades econômicas do município são: minério, comércio, extração de madeira, pesca, pecuária e turismo.

4.1.1.2. Clima, vegetação e hidrologia

O clima de Barcarena faz parte do clima quente equatorial úmido, com temperatura média anual entre 29 e 31° C com chuvas abundantes, acima de 2.500 mm ano que ocorrem no primeiro semestre e menos intensamente no segundo semestre.

A cobertura vegetal primitiva de Floresta Densa dos baixos platôs Pará/Maranhão foi quase totalmente substituída pelo pasto e pelo plantio de culturas de subsistência em áreas de regeneração de Floresta Secundária. Ao longo das margens dos rios e igarapés preponderam as Florestas Ciliares e de várzeas nos trechos sob influência de inundações, ocorrendo, também, a siriúba (mangue branco), e florestas de várzeas margeando os grandes rios e as Ilhas do Município que são derrubadas para o extrativismo de madeira. As palmeiras mais comuns são: *Euterpe oleracea* (açai), *Mauritia flexuosa* (buriti), *Maximiliana regia* (inajá) e *Oenocarpus bataua* (bacaba).

Uma pequena faixa de mata do tipo campina é descrita na Ilha Trambioca, caracterizada como uma área aberta, coberta com vegetação herbácea e ciporácea do tipo mata de cipó. O solo é do tipo arenoso com depressões que facilitam a formação de coleções de água e a vegetação é muito semelhante às áreas de igapó.

4.1.1.3. Fauna de mamíferos e de triatomíneos descritas

A partir de um caso agudo de DCA em Barcarena por Valente S *et al.* (1989) foi realizado nos anos 90 pelo IEC apoiado pela ALBRAS um amplo estudo no município que identificou reservatórios e vetores silvestres do *T. cruzi* nas localidades Área de Preservação Ambiental (Azul, Laranjal e Eucalipto 86), Núcleo Urbano e Alojamento, Cafezal, Carnapijô e Araquiçaua em Barcarena.

Valente S *et al.* (1992) observaram palmeiras (*Maximiliana regia* - Inajá), *Schelea martiana* - Urucuri e *Eleas melanococa* - Dendê do Pará) em matas secundárias próximas do Núcleo Urbano e Alojamento e também e em matas primárias de área rural das comunidade Cafezal, Carnapijô e Araquiçaua infestadas com triatomíneos dos gêneros *Rhodnius*, *Panstrongylus*, *Microtriatoma* e *Eratyrus* e marsupiais, roedores e tamanduás com diferentes taxas de infecção para *T. cruzi*. Na pesquisa sorológica realizada nas comunidades não apresentaram resultados relevantes.

Na ocasião os autores recomendaram providências para controle vetorial junto às autoridades sanitárias locais que incluíam vigilância entomológica e epidemiológica, educação sanitária e investigação e acompanhamento de casos febris de origem desconhecida.

4.1.2. Município de Belém - Pará

Os dados sobre o município de Belém foram coletados no site elaborado pelo Governo do Estado do Pará (Pará, 2006).

4.1.2.1. Localização, população e economia

O município de Belém, (figura 6), pertence à mesorregião Metropolitana de Belém e à microrregião Belém; A sede Municipal tem as seguintes coordenadas geográficas: 01°27'20" de latitude e 40°30'15" de longitude a Oeste de Greenwich. Limita-se ao norte a Baía do Marajó, a leste Municípios de Ananindeua, Santo Antônio do Tauá e Santa Bárbara, ao Sul Município de Acará e a Oeste a Baía do Guajará e Baía do Marajó em uma área territorial de 1.319,70 km². A população do município era estimada pelo IBGE (2005) em 1.405.871 habitantes. A economia do município é impulsionada pela indústria, comércio, pesca e turismo.

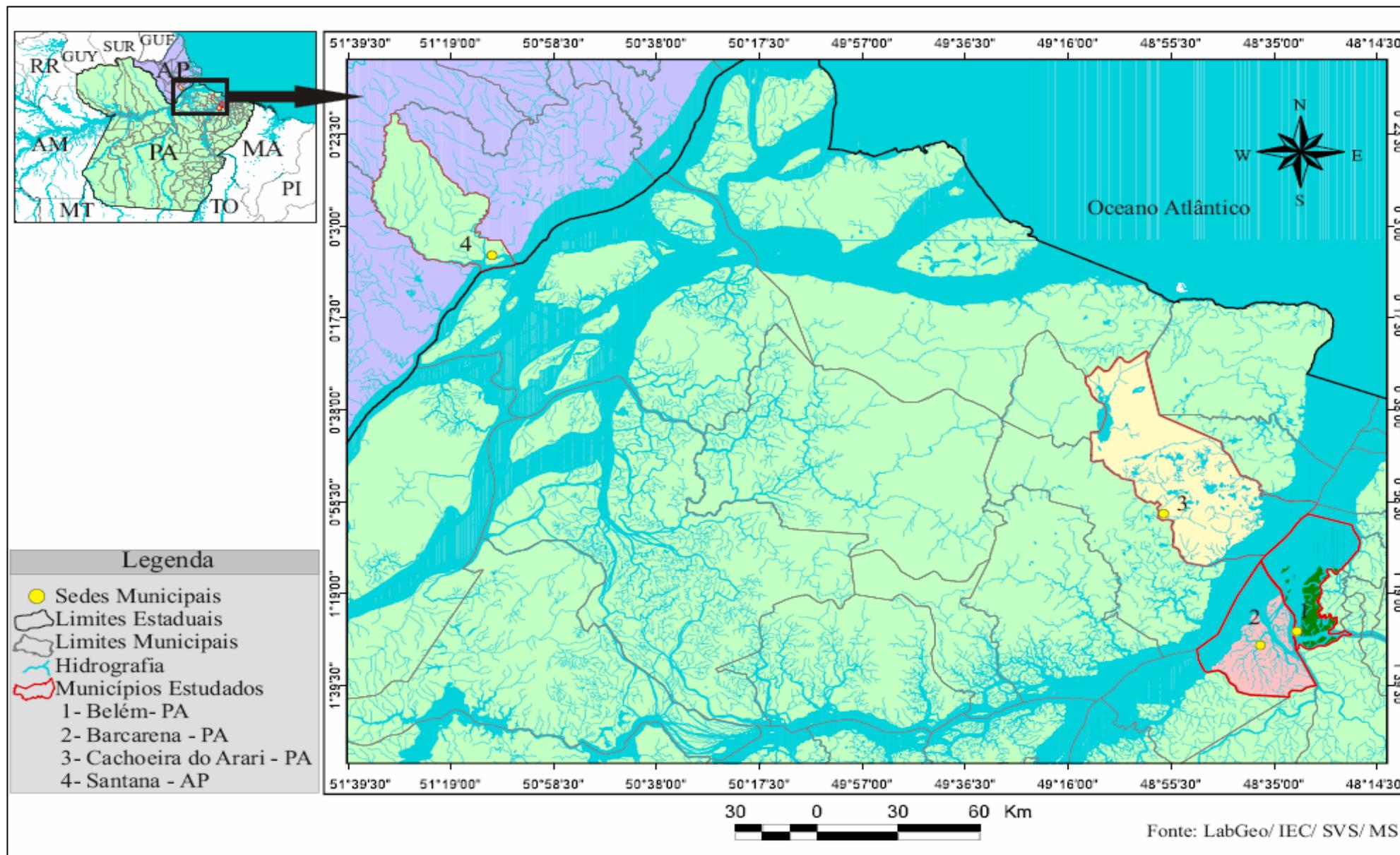


Figura 6. Municípios de Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari, Estado do Pará e Santana, Estado do Amapá onde foram realizados os estudos.

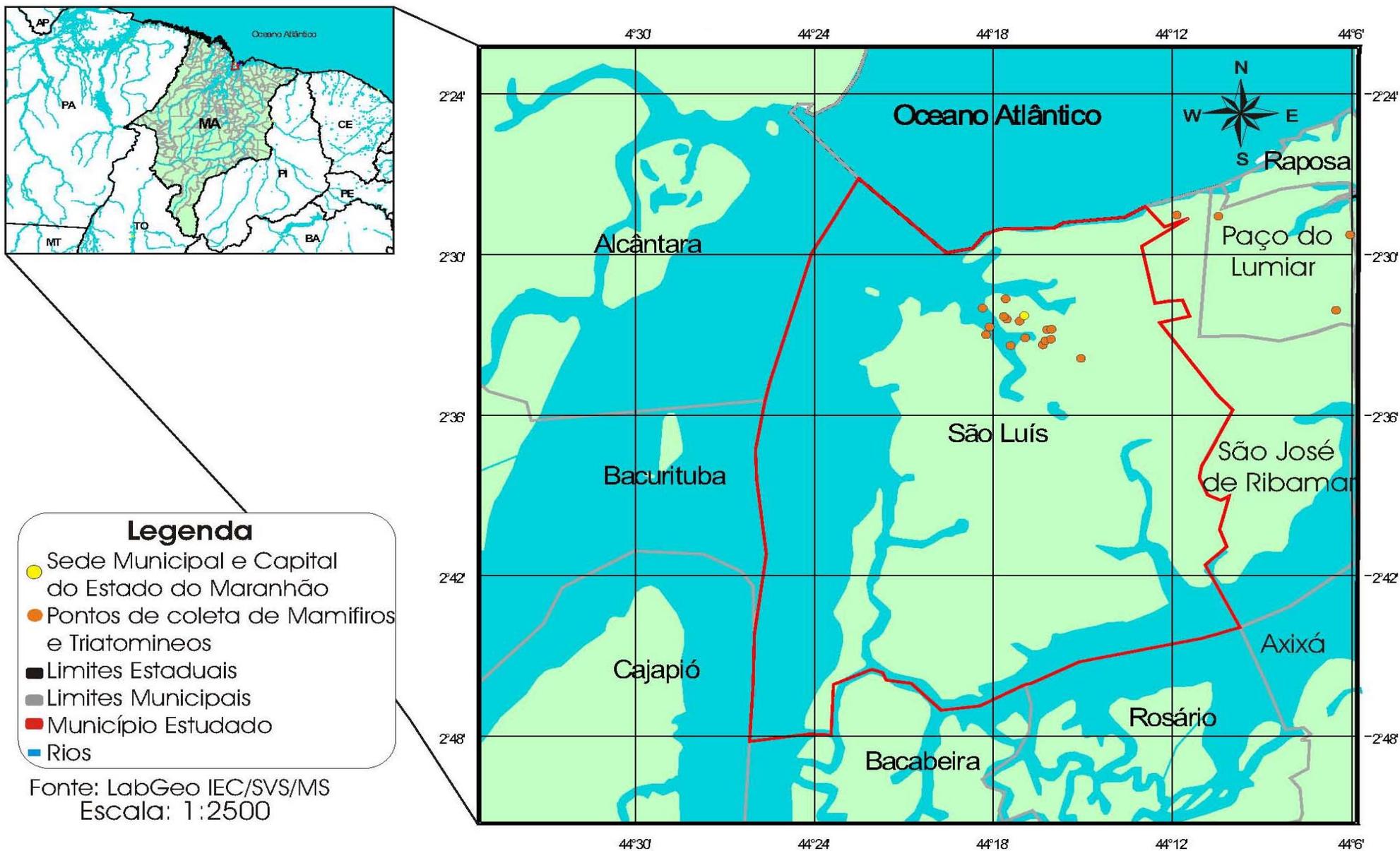


Figura 7. Bairros do Município de São Luís para estudo do ciclo de *T. cruzi*

4.1.2.2. Clima, vegetação, hidrologia e fauna

O clima é quente e úmido com precipitação média anual alcançando os 2.834 mm. A temperatura média é de 25°C, em fevereiro e 26°C, em novembro. Está na zona climática Af (classificação de Köppen), que coincide com o clima de floresta tropical, permanentemente úmido, com ausência de estação fria, e temperatura do mês menos quente, acima de 18°C.

A cobertura vegetal do Município compõe-se de Florestas Secundárias ou capoeiras que substituíram a antiga Floresta Densa dos baixos platôs, da qual alguns testemunhos ainda são encontrados em Mosqueiro, Caratateua e áreas adjacentes. A vegetação dos mangues e siriubais acompanham as porções fluviais e semilitorâneas do setor estuarino, enquanto a Floresta Ombrófila (que gosta de água) domina os tratos marginais dos cursos d'água e as baixadas, onde prevalecem formações herbáceas, subarbustivas e arbustivas.

A alteração da cobertura vegetal observada utilizando imagens LANDSAT - TM, do ano de 1986, era de 54,73%. A situação torna-se preocupante, ao se levar em consideração o tamanho do pequeno Município, a velocidade do desmatamento, a crescente ocupação urbana, e a dilapidação das florestas remanescentes, restando florestas pobres, com funções e estruturas alteradas. São muito restritas as áreas de matas preservadas em Belém, porém com presença de ponta de matas do tipo capoeira ainda são vistas na periferia da cidade e de lá procedem achados eventuais de triatomíneos atraídos pela luz e da presença de roedores e marsupiais de acordo com trabalhos já realizados no município (Lainson *et al.*, 1979, Miles *et al.*, 1981a,b).

Os principais acidentes geográficos do Município são: as baías de Marajó, ao norte e Guajará, a oeste. Nesta última deságua o rio Guamá que em conjunto, contribui para a conformação peninsular do Município. Na baía de Guajará deságuam os igarapés, Bacuri, Val-de-Cães, Una e o furo do Maguari que separa a Ilha de Caratateua (Outeiro) do continente. Em frente à baía do Marajó, situa-se a ilha de Mosqueiro, onde toda sua orla, a noroeste, é constituída por praias, como: Chapéu Virado, Farol, Ariramba, Murubira e muitas outras. Esta Ilha é separada do continente através da baía do Sol e pelo furo das Marinhas. Entre as ilhas de Mosqueiro e Caratateua, encontra-se a baía de Santo Antônio, onde deságuam os rios Pratiuará e Marí-Marí.

No rio Guamá, desembocam os igarapés Tucunduba e Água Preta. Este faz limite natural com Ananindeua, a sudeste. Na foz do Guamá, aparecem três grandes ilhas que são: Cumbú, do Marinheiro e Grande ou Paulo Cunha.

O rio Guamá e as bacias de Guajará e Marajó são acidentes geográficos importantes na sua conformação, e as ilhas mais importantes são: Grande, Ilhinha, Marinheiro, Cambú, Patos, Barra, Jararaca, Urubuoca, Nova Paquetá, Jutuba, Croinha, Cotijuba, Mosqueiro, Caratateua, Papagaio,

Camuaru, Conceição e Maruim.

O Museu Paraense “Emílio Goeldi” e o Bosque “Rodrigues Alves” conservam espécies da flora e fauna paraense. É necessária a preservação do ecossistema remanescente dos mananciais do Utinga e as praias de Icoaraci, Outeiro (ou Caratateua), Mosqueiro e Cotijuba. A topografia do Município é pouco variável e baixa, atingindo 25 metros na ilha de Mosqueiro, ponto de altitude máxima. Na área urbana da cidade de Belém, grandes áreas estão abaixo da cota de 4 metros, sofrendo influência das marés altas e tendo dificuldade no escoamento das águas da chuva. São as Chamadas “baixadas de Belém”.

4.1.3. Município de Cachoeira do Arari – Pará

4.1.3.1. Localização, população e economia

Os dados do município de Cachoeira do Arari foram coletados no site elaborado pelo Governo do Estado do Pará (Pará, 2006).

O município de Cachoeira do Arari pertence à mesorregião do Marajó e a microrregião do Arari. A sede municipal tem as seguintes coordenadas geográficas: 01° 00' 36" de latitude sul e 48°57'36" de longitude a Oeste de Greenwich. Seus limites são: Ao norte: Municípios de Chaves e Soure; a leste: Município de Ponta de Pedras; ao sul Municípios de Salvaterra e Baía do Marajó e a oeste Municípios de Ponta de Pedras e Santa Cruz do Arari. A população do Município era estimada em 17.127 habitantes de acordo com o IBGE (2005) e a área territorial do município é de 3.102,10 km². As principais atividades econômicas do Arquipélago são: extração de madeira, pesca, pecuária e turismo.

4.1.3.2. Clima, vegetação, hidrologia e fauna

O clima equatorial úmido: temperatura média em torno de 27°C, mínima de 18°C e máxima de 36°C, umidade elevada e alta pluviosidade nos seis primeiros meses do ano. O relevo é plano e a sede do município é o ponto mais alto da ilha. A principal paisagem geográfica do Município é o rio Arari, que delimita territórios com demais municípios da Região.

Predominam no município vegetação de floresta densa de Terra Firme, Campos Cerrados, Campos Altos e Baixos com extensas faixas florestais dominadas pelas palmeiras de *Orbygnia sp* (babaçu); *Maximiliana regia* (inajá); *Astrocaryum vulgare* (tucumã) e *Mauritia flexuosa* (buriti), este cenário sofre com queimadas e exploração de madeira comprometendo flora e fauna regionais.

Nas faixas do Rio Arari que incluem os municípios de Soure e Salvaterra em regiões próximas ao litoral, apesar de cercada por água, na estação chuvosa as águas do mar crescem e se misturam com as águas doces do Arari deixando-as salobra e imprópria para o consumo. Por outro lado, durante

a época de seca, grandes faixas de terra secam e há escassez de água para consumo das comunidades ribeirinhas e os moradores precisam deslocar-se para lugares distantes a fim de conseguir água potável.

Os lagos do município possibilitam a formação de extensas coleções de água estagnadas impróprias para o consumo humano, mas propícios para manutenção de criadouros de mosquitos (*Anopheles intermedius*, *Anopheles aquasalis*, *Anopheles oswaldoi*, *Culex portesi*, *Coquillettidia venezuelensis*) transmissores de doenças Mascarenhas *et. al.*, (2001).

Estudos sobre a fauna da mesorregião do Marajó realizado por Mascarenhas *et. al.* (2001) identificou uma rica e diversificada biodiversidade composta por marsupiais, *D. marsupialis* (mucura) e *Philander opossum*, *Dasypus novemcinctus* (tatu galinha), *Mazama gouazoubira* (veado fuboca), *Tamandua tetradactyla* (tamanduá coleite) e *Sciurus sp.* (quatipuru), *Bradypus tridactylus* (preguiça comum), *Cíclopes tridactyllus* (tamanduai), *Choloepus didactylus* (preguiça real), *Procyon cancrivorus* (guaxinin), *Nasua nasua* (coati), *Eira barbara* (irara) e *Cerdocyon thous* (raposa), macacos *Cebus apella* (macaco prego), *Saimiri sciureus* (macaco de cheiro) e *Saguinus midas niger* (macaco sagüi) além de uma diversificada fauna de aves e répteis.

4.1.4. Município de Santana – Amapá

Os dados do município de Macapá foram compilados a partir do trabalho de Rodrigues (2004).

4.1.4.1. Localização, população e economia

Santana está no sudeste do Estado do Amapá e é o segundo município mais populoso do Amapá, com 101.864 habitantes com dados do IBGE (2005) e área de 1.599,70 km² fazendo limites com Macapá, Mazagão e Porto Grande. A sede do município é na ilha de Santana e as localidades principais são o Igarapé da Fortaleza e Igarapé do Lago. A população da sede do município foi estimada segundo o IBGE (2005) em 92.190 habitantes. A economia do município baseia-se na pecuária, atividade pesqueira, extração da madeira e açaí, indústria de cerâmica, palmito, refrigerante e reciclagem de papel.

4.1.4.2. Clima, vegetação, hidrologia e fauna

O clima da ilha está dentro da zona climática tropical chuvosa é do tipo equatorial úmido e a temperatura entre 27°C a 35°C, com estação chuvosa de janeiro a junho e seca de julho a dezembro e precipitação anual entre 1.415 mm e 1.835 mm. A vegetação é formada por campos naturais inundáveis, regiões de várzea e florestas primárias e secundárias que cedem espaço para a pecuária.

A Ilha possui vasta rede hidrográfica representada pelo Rio Amazonas e seus afluentes de rios, lagos e igarapés que não sofrem influência de salinidade do mar. A fauna silvestre remanescente é representada por um reduzido número de espécies, algumas já em extinção como a anta, o veado vermelho, a onça pintada e o gato maracajá. Entre as espécies ainda existentes na ilha, mas que se encontram ameaçados de extinção, estão a capivara, o tamanduá coleto, tatu bola, cutias, porco espinho, bando de macacos, várias espécies de marsupiais, roedores, répteis, morcegos e uma diversificada fauna de aves que tem ninhais em ilhas próximas a Santana. A maioria destes animais, com exceção dos morcegos, é caçada pelos moradores que os consomem como alimentos.

Santana é o segundo município do estado com números de ocorrência de casos agudos de doença de Chagas aguda no Estado somando até 2008, cento e sessenta e cinco casos, a maioria deles através de surtos, como o que ocorreu na comunidade do Igarapé da Fortaleza um grupo de 25 pessoas com o envolvimento de consumo do açaí na transmissão. Estudos preliminares encontraram no entorno da comunidade a presença de triatomíneos e reservatórios silvestres infectados com *T. cruzi* que estariam associados na transmissão (Valente V *et al.*, 1998; Valente S *et al.*, 2005).

4.1.5. Município de São Luís - Maranhão

Os dados do município de São Luís foram coletados no site elaborado pelo Governo do Estado do Maranhão Maranhão, (2009).

4.1.5.1. Localização, população, saúde e histórico

São Luís é a capital do Estado do Maranhão e tem localização geográfica com Latitude S 2°31' Longitude W 44°16'. Área da unidade territorial de 827 km² e altitude de 24 metros. O limite do território de São Luís começa na foz do rio Jaguarema, na área do Araçagi e termina na Baía do Arraial, no limite com São José de Ribamar. O município ocupa mais da metade da ilha (57%) e apresenta clima tropical quente e semi-úmido da Zona Equatorial com duas estações distintas, o inverno chuvoso de janeiro a junho, com média pluviométrica de 1953 mm, e o verão quente e seco de julho a dezembro. A temperatura média anual varia de 23°C a 33°C. A população é estimada em 870.028 habitantes (IBGE, 2005).

4.1.5.2. Clima, vegetação, hidrologia e fauna

O clima regional alterna período de fortes chuvas, com áreas de extenso alagamento, e de campos em sua porção norte-ocidental, em face da cobertura vegetal de floresta úmida tropical, esta Região recebeu a denominação geopolítica de pré-Amazônia e áreas de cerrado, caatingas e

chapadões que seguem em direção ao estado do Piauí. Em todos os modelos de relevo há uma franca predominância de palmeiras de babaçu cujas palmas e óleo se constitui importante atividade extrativista. A hidrologia regional converge os rios genuinamente maranhenses como o Mearim, Pindaré, Itaperucu e Mundin.

Na Ilha de São Luís o relevo predominante apresenta elevações de até 15 m acima do nível do mar e em alguns bairros de área baixa entrecortados por igarapés que sofrem com a influência das marés. Nas áreas não inundadas a vegetação predominante é composta por palmeiras e árvores frutíferas nos quintais que circundam as habitações. As casas são de construções precárias e com presença nos quintais da criação de animais domésticos. A menos de 3 km destas residências ainda há uma faixa considerável de manguezais já completamente poluídos de onde os moradores ainda coletam caranguejos e mexilhões para consumo alimentar.

A fauna de mamíferos predominante nos bairros estudados é praticamente inexistente, mas na área do batalhão do Ministério do Exército situado no Bairro de João Paulo, há uma pequena ponta de mata de capoeira e vegetação de várzea com gramíneas, além da presença de palmeiras de açaí e buriti. Os militares entrevistados relatam a presença de marsupiais (*D. marsupialis* e *P. opossum*) e excepcionalmente o encontro de sagüis (*Saguinus bicolor* e *Saguinus niger*). Referem ainda presença de *Iguana iguana* (camaleão) e pássaros de variadas espécies e que apesar do policiamento, moradores entram clandestinamente na área para caçar e pescar e são reprimidos pelos militares.

Há 10 km a sudoeste do centro urbano de São Luís entre a margem direita do Rio Bacanga e a Região do Maracanã existe o Parque Estadual do Bacanga com uma área de 3.075 hectares, que preserva o ambiente de Floresta Amazônica e protege os mananciais que abastecem a cidade. Apresenta relevo plano e ambiente costeiros, influenciado pelas marés nas áreas de manguezais, colinas e vales. A vegetação é de mata primária alta e secundária com mata de capoeira e árvores frutíferas. Nesta reserva foram coletados *Proechimys guyanensis*, *Didelphis marsupialis*, sendo que 3 deles foi possível isolar tripanossomos. Foi registrada a presença de preguiças, gato macacajá, esquilos, iraras, coatis, cotias, raposas, macacos, tamanduás, porco espinho, e várias espécies de aves, anfíbios e répteis.

Dados da Fundação Nacional de Saúde referem desde 1977 a infestação de casas em São Luís pelo *Triatoma rubrofasciata*, De Geer, (1773) infectados com *Tripanossoma* sp, e do achado de triatomíneos silvestres, *R. pictipes* e *Rhodnius neglectus* principalmente, com altas taxas de infecção para tripanossomas (Macario-Rebelo *et. al.*, 1999). Mais tarde, Valente, *et. al.* (1995) caracterizados como *T. cruzi* e associaram o achado dos triatomíneos com ratos domésticos, também infectados.

4.2. APRESENTAÇÃO DOS SURTOS DE DOENÇA DE CHAGAS NOS ESTADOS DO PARÁ E AMAPÁ SELECIONADOS E DOS ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS NO ESTADO DO MARANHÃO

Dos diversos surtos detectados nos últimos anos, para um estudo mais aprofundado nessa tese, foram selecionados quatro surtos, três no estado do Pará, municípios de Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari, todos com 12 casos em cada surto e um no Amapá, município de Santana com 27 casos, com um total de 63 casos nos quatro surtos. As datas dos surtos foram às seguintes: Barcarena entre os dias 18/09/2006 a 01/10/2006; Belém entre os dias 04/07/2003 a 11/08/2003; Cachoeira do Arari entre os dias 06 e 30/08/2006 e Santana entre os dias 04 e 19/12/2004.

Esses quatro surtos foram selecionados para caracterização nesse estudo pelos seguintes motivos: a) todos apresentaram mais de 10 casos de DCA, com diversificadas formas clínicas; b) há uma clara separação espacial entre os surtos; c) ocorreram em regiões separadas onde outros surtos já haviam sido descritos; d) as regiões onde esses municípios se encontram apresentam altos índices demográficos e sofreram alterações ambientais importantes; e) são separadas por significativa distância geográfica e rios; e) os surtos foram associados à infecção pela via oral de acordo com a investigação epidemiológica realizada; e) foi possível fazer um estudo entomológico e dos reservatórios dos locais de ocorrência dos surtos, exceto o de Belém ocorrido num bairro central.

4.2.1. Surto de Barcarena, Pará

O surto ocorreu em outubro de 2006 na localidade de Vila do Conde município de Barcarena (latitude 01° 33' 56.4", longitude 48° 45' 55.4") e acometeu um grupo de 12 pessoas que trabalhavam e/ou freqüentavam um posto de saúde local apresentado quadro de síndrome febril aguda prolongada, em alguns casos acompanhados de exantema.

As 12 pessoas tinham relação espaço-temporal de proximidade, sendo 5 pertencentes a um grupo de profissionais da saúde que trabalhavam juntas no Posto de Saúde da Família (PSF) local e outras eram conhecidas ou moravam em casas vizinhas ao Posto. A faixa etária do grupo variava entre 15 e 70 anos. Os pacientes adoeceram entre os dias 18/09/2006 a 01/10/2006. O paciente índice foi senhora LPL de 40 a, que trabalha no PSF de Vila dos Cabanos e procurou um hospital local com diagnóstico inicial de dengue clássico recebendo medicação sintomática.

Dirigiu-se ao IEC e em consulta revelou que desde o dia 18/09 teve febre alta entre 38 e 40°C, calafrios, cefaleia, mialgia e dor nas articulações. Apresentou ainda eritema difuso em todo o corpo e nodoso nos membros inferiores nos 12 primeiros dias de doença. Informou que outros colegas de trabalho exibiam sintomas semelhantes, estes mais tarde foram encaminhados para o IEC que confirmou os 12 casos como DCA através de exames sorológicos e parasitológicos específicos. Os

pacientes não exibiram porta de entrada, não se ausentaram do estado nem do município há pelo menos 40 dias, não se submeteram a transfusões, nem mencionaram a presença de triatomíneos em seus domicílios. O acometimento cardíaco foi evidente em um paciente que manifestou pericardite observada ao eco-cardiograma sem outros sinais clínicos importantes de acometimento cardíaco. Apesar de um dos pacientes relatar palpitações e lipotímia, não foram detectadas alterações importantes no eletrocardiograma de repouso, realizado em todos durante a fase aguda.

Uma das pacientes não trabalhava no hospital, mas teria visitado uma amiga agente de saúde que a convidou para o almoço. Especulou-se que a doença teria sido adquirida pela ingestão de um suco de açaí consumido em comum pelo grupo de pacientes, mas não recordam precisamente a data. Uma ampla pesquisa sorológica foi realizada na localidade para busca de outros casos associados ao surto. Os pacientes foram tratados com medicação específica e são acompanhados pelo IEC.

4.2.2. Surto de Belém, Pará

O surto ocorreu entre os dias 04/07/2003 a 11/08/2003 no Bairro do Telégrafo Região central de Belém com localização geográfica 01° 27"20" de latitude Sul e 48°30"15", acometeu 12 pessoas, sendo que 9 pertenciam a 4 famílias distintas e moravam na mesma rua, e outras 3 de distintas famílias que não se conheciam e moravam em uma rua próxima. O paciente índice foi o Sr. AFC 57a., que procurou consultório de rede privada apresentando história de febre acompanhada de calafrios e duração de 10 dias que cedia com antitérmicos, cefaleia, mialgia, artralgia, edema de membros inferiores e exantema. Posteriormente, outros 2 familiares (esposa e filha) exibiram os mesmos sintomas e procuraram atendimento médico. Um paciente jovem apresentou quadro de miocardiopatia bem visível no eco-cardiograma sem nenhuma outra disfunção cardíaca, apesar de dois pacientes apresentarem dispnéia e outro que se queixava de dor precordial.

Simultaneamente, 3 famílias com dois componentes cada uma e 3 pacientes, aqui caracterizados como avulsos, procuraram diferentes serviços de saúde e foram encaminhados ao IEC que confirmou os 12 casos como DCA através de exames sorológicos e parasitológicos específicos.

Na investigação foi observado vínculo multifamiliar e relação espaço temporal entre a maioria dos pacientes e não foi observada relação laboral entre os mesmos. Nenhum dos pacientes apresentava porta de entrada, não se ausentaram do estado nem do município nos 2 meses anteriores, não se submeteram a transfusões, nem mencionaram a presença de triatomíneos em seus domicílios. Os pacientes tinham em comum o consumo diário de açaí adquirido de um mesmo fornecedor. Não foi possível estabelecer um dia provável de infecção. Uma ampla pesquisa sorológica foi realizada no bairro para busca de outros casos associados ao surto. Os pacientes foram tratados no IEC.

4.2.3. Surto de Cachoeira de Arari, Pará

O período de adoecimento das pessoas neste surto foi entre os dias 06 e 30/08/2006 acometendo um grupo de 12 pessoas de uma colônia de pescadores que moravam no Rio Urubuquara, localidade do Igarapé do Mata Fome, Município de Cachoeira do Arari, PA. Eram componentes de duas famílias que passaram os meses de agosto e meados de setembro no Igarapé do Mata Fome para exploração e coleta de frutos de açaí. A faixa etária dos pacientes estava entre os limites de 2 a 52 anos de idade e todos os que estavam nessa localidade adoeceram. O paciente índice foi o menor MDT 10 a, que apresentava sintomas de febre elevada, dor abdominal, cefaleia intensa, edema de face e de membros inferiores, calafrios, mialgia, artralgia, eritema cutâneo e palidez cutânea mucosa.

De maneira semelhante ao surto de Barcarena, os pacientes de Cachoeira do Arari também não exibiram porta de entrada, não se ausentaram do estado nem do município há pelo menos 40 dias, e também não se submeteram a transfusões. Os familiares relatam o consumo diário de açaí e informaram ainda que a noite esses insetos voavam atraídos pela luz de lâmpadas utilizadas para iluminação e tentavam se alimentar nas pessoas que se abrigavam em domicílios de construção precárias. Seguindo o mesmo protocolo utilizado em Barcarena, também foi realizada em Cachoeira do Arari uma ampla pesquisa sorológica em comunidades ao longo do Rio Urubuquara para se dimensionar a extensão do surto.

4.2.4. Surto de Santana, Amapá

O IEC foi acionado pela Secretaria Estadual de Saúde do Amapá em janeiro de 2005 para auxiliar na investigação de surto febril com acometimento cardíaco em um grupo de moradores da Comunidade Igarapé da Fortaleza, distante a 18 km do centro de Macapá. Nas investigações foram identificados 27 casos de DCA caracterizados clinicamente e laboratorialmente que pertenciam a 8 famílias distintas, sugerindo tratar-se de surto, similar com outros já ocorridos no Estado. Os pacientes apresentaram, no início da doença entre os dias 04 a 19/12/2004 quadro febril com calafrios, mialgia, artralgia, cefaléia e comprometimento cardíaco que se manifestou, sobretudo nos mais jovens. A faixa etária dos pacientes ficou entre 1 e 31 anos. Após passarem por vários serviços médicos na suspeita de malária uma lâmina em gota espessa apresentou positivo para DCA. Os pacientes após o diagnóstico foram tratados com medicação específica e acompanhados pelo IEC. A suspeita da transmissão coletiva foi investigada por técnicos da SMS local e pelo IEC sugerindo a transmissão ter ocorrido pela ingestão de açaí consumido de um fornecedor comum.

Em todos os surtos identificados (Barcarena, Belém, Cachoeira do Arari no Pará e Santana no Amapá) realizou-se estudos soro-parasitológico para pesquisa de doença de Chagas entre parentes diretos, vizinhos e contatos dos pacientes e posteriormente num grupo maior da comunidade consistindo de pesquisa sorológica hemaglutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IF- IgG e IgM) qualitativas para triagem e IF quantitativa para teste confirmação, e parasitológicas (Gota espessa, QBC, xenodiagnóstico e hemocultura).

Foi realizado ainda um estudo epidemiológico e demogeográfico na área (entomológico e de captura de mamíferos silvestres) que possibilitasse a identificação da forma de transmissão.

4.2.5. Visitas às áreas de estudo

Os estudos foram realizados entre os anos de 1995 e 2007, com duas excursões anuais aos municípios descritos permanecendo-se um período entre 12 e 21 dias. A equipe foi composta por três profissionais para as coletas de animais e triatomíneos. As secretarias de saúde locais visitaram as residências para coleta de sangue e anamnese da população envolvida. Quando detectado um caso agudo de doença de Chagas, esses eram encaminhados por meio de procedimentos de Tratamento Fora de Domicílio (TFD) para complementação de diagnóstico e tratamento específico no Instituto Evandro Chagas.

4.3. ESTUDO DOS TRIATOMÍNEOS

4.3.1. Coleta de triatomíneos em domicílios e anexos por busca ativa

A pesquisa foi realizada em residências e no peridomicílio com coletas diurna e noturna entre 19:00 e 23:00 hs. Os espécimes foram coletados manualmente, com auxílio de pinças, sem uso de desalojantes químicos e acondicionados em frascos individuais, rotulados e identificados (Figura 8).

4.3.2. Coleta de triatomíneos silvestres

4.3.2.1. Em palmeiras

Foram seguidas as técnicas descritas por Miles *et al.* (1981b) e de Noireau *et al.* (1999) em árvores com copa larga e presença de ninhos e refúgios de animais e selecionadas próximas de domicílios. O chão foi limpo e preparado com a cobertura de plástico branco para dissecação. Os instrumentos para corte e dissecação da palmeira foram motosserra e para a dissecação, terçados, luvas e pinças. Os insetos capturados foram acondicionados em frascos plásticos com tampa perfurada, permitindo ventilação adequada. Os frascos foram rotulados com o nome da palmeira, local

e data e transportados para o laboratório. Os exemplares coletados foram acondicionados em frascos individuais, rotulados com todos os dados de identificação.



Figura 8. Triatomíneos capturados na palmeira *M. flexuosa* (miriti) e em armadilhas de luz

4.3.2.2. Com armadilha de luz

A armadilha de luz utilizada (Figura 8) foi o modelo *Pennsylvania Trap*, descrito por Sontwood (1978). Basicamente, é constituída de uma fonte luminosa, lâmpada fluorescente de 20 W/ 120 volts, guarnecida por três lâminas metálicas verticais de *aproximadamente* 20 por 100 cm, pendentes de uma cobertura plana quadrada e metálica, radialmente dispostas de modo a formar três ângulos de 90° em torno da lâmpada. Na borda inferior as lâminas levam à abertura de um funil, em cujo vértice inferior se dispõe um saco de pano coletor dos espécimes atraídos pela luz. A armadilha luminosa é suspensa por corda de náilon em árvores mais altas que as palmeiras (cerca de 20 m acima do nível do solo). A fonte

de luz será alimentada por gerador e/ou bateria automotiva, de 19:00 às 22:00 h, durante 10 dias consecutivos por excursão.

4.4. ESTUDOS DE ANIMAIS SILVESTRES

Todos os trabalhos com animais silvestres foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IEC Anexo 5 e as coletas autorizadas pelo IBAMA. Anexo 6. Os mamíferos silvestres foram capturados com armadilhas de Tomahawk, medindo 50x20x19 cm (comprimento, altura e largura) para animais de peso médio de 2 kg, tendo como isca banana, abacaxi ou espiga de milho (Figura 9). Os animais capturados (Figura 10) foram imobilizados e sedados com fenobarbital sódico (Sagatal[®], RHODIA, 10 mg/ml, diluídos a 1:20 ml em soro fisiológico), aplicando-se entre 0,5 e 1 ml por via intraperitoneal. Os animais foram então, submetidos à punção venosa ou punção cardíaca e a amostra de sangue obtida utilizada para semeadura em meios de cultivo bifásico (3 tubos por animal), exame parasitológico a fresco, esfregaço e gota espessa. Em seguida, os animais foram submetidos à xenodiagnóstico com duas caixas contendo cinco ninfas de terceiro estágio de *R. prolixus* ou *T. infestans*, mantidos em colônias no insetário do IEC, para cada animal. Essas caixas, identificadas com os dados relativos ao animal e à espécie de triatomíneo, eram presas ao animal por no mínimo 20 min., tempo necessário para que os insetos completassem o repasto sanguíneo. Os animais capturados foram identificados no IEC baseando-se na chave taxonômica de PETERSON & PINE (1982).



Figura 9. Armadilha de Tomahawk e captura de mamíferos silvestres



Figura 10. Mamífero silvestre, *D. marsupialis* com aparelho para seguimento e capturado em trabalhos de campo.

4.5. ESTUDOS DA POPULAÇÃO HUMANA

O protocolo com os procedimentos adotados na pesquisa com seres humanos foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IEC (Anexo 7). Foram também discutidos com a própria comunidade-alvo os objetivos do trabalho (figura 11) e a necessidade de assinatura de Termo de Adesão individual (Anexo 8) à coleta de sangue e à prestação de informações.



Figura 11. Conversa com as comunidades sobre os objetivos do trabalho

4.5.1. Identificação de casos agudos de doença de Chagas e tratamento dos pacientes

Pacientes com suspeita de DCA foram encaminhados pelo SUS ou rede médica particular dos municípios estudados e avaliados pelo Ambulatório de Doença de Chagas do IEC com coleta de informações clínicas e epidemiológicas em fichas apropriadas (Anexo 9) para caracterização dos casos como isolados ou de um surto. Aqueles casos confirmados receberam tratamento específico.

4.5.2. Coleta de material

As coletas de sangue (10 a 15 ml) foram realizadas por punção venosa e em papel de filtro por punção digital nos menores de 5 anos. Toda a coleta foi realizada com material descartável, (seringas, agulhas e lancetas).

4.5.3. Exames parasitológicos

4.5.3.1. Pesquisa de *T. cruzi* em gota espessa e pelo método de concentração *QBC® System Quantitative Buffy Coat*

Confecção de lâmina pela gota espessa com coloração pelo Giemsa e examinada em microscopia ótica com objetiva de 40X. Para o teste de *QBC®* foram utilizados 4 capilares por paciente seguindo os procedimentos apresentados pelo fabricante e examinadas na faixa de leitura recomendada. Nos dois testes foram examinados no mínimo 500 campos por 3 técnicos.

4.5.3.2. Hemocultura e xenodiagnóstico artificial

Os meios utilizados foram o bifásico de Hoff's (4 tubos por paciente) com semeio de 500 µl de sangue por tubo e quando os parasitos alcançavam crescimentos eram transferidos para meios líquidos RPMI 1640 e/ou meio LIT para crescimento exponencial. A leitura dos meios ocorria entre 20 a 25 dias e persistindo negatificação por 90 dias eram descartados. Preparação e constituição dos meios são descritos no Anexo 10.

Um volume entre 10 e 15 ml de sangue com anticoagulante heparina sódica foi distribuído em um cilindro de vidro revestido com uma membrana de borracha que permitia a alimentação de ninfas de triatomíneos. O sistema era aquecido por um banho-maria que mantinha os cilindros aquecidos numa temperatura entre 37 e 39°C, para estimular a alimentação dos triatomíneos. As espécies de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* foram utilizadas na alimentação com 20 ninfas

de 5º estágio e em jejum de 60 dias, por paciente. As espécies foram mantidas no insetário do IEC e o exame do conteúdo intestinal dos triatomíneos foi feito com 30 e 60 dias após a alimentação.

4.5.4. Definição de amostragem e pesquisa sorológica

Definiu-se a amostragem nas populações através de cálculos estatísticos dos Softwares Stat Calc versão 4.0 e Epi Info 5.0 que consideram a relação entre o número de casos na população e o impacto do agravo nos grupos afetados de acordo com o tamanho da comunidade com a aplicação da fórmula para cálculo de população infinita:

$N = (1,96)^2 \cdot p \cdot q / L^2$ cuja razão 1,96² é a probabilidade de distribuição normal do evento; p: probabilidade do evento existir; q: probabilidade do evento não existir (1-p); L: erro aceitável de 2%. A repercussão dos casos agudos nas comunidades elevou o número de amostragem mínima pela procura espontânea de pessoas para coleta de material. Na área rural de Cachoeira do Arari, os casos de DCA ocorreram em comunidades pequenas (entre 200 a 500 habitantes) e a amostragem foi sempre acima da recomendada pelos cálculos estatísticos como apresentados na tabela 3

Tabela 3. ¹Estudo sorológico para doença de Chagas nos municípios de Barcarena, Belém, Cachoeira do Arari (PA), Santana (AP) e São Luís (MA) entre os anos de 2003 e 2007.

Município	Pop. IBGE Município	Nº de casos	Pop. Local	% de infectados na pop. local	Pop. Estudada	% pop estudada
Barcarena (PA)	102.015	12	1630	0,73	1230	75,46
Belém	1.437.000	12	2188	0,54	436	19,92
C. do Arari (PA)	117.127	12	680	1,76	546	80,29
Santana (AP)	100.924	27	676	3,99	436	64,49
São Luís (MA)	870.028	-	3298	0,18	1336	40,5
Total	2.627,094	63	8472	0,74	3984	47,02

¹Triagem sorológica por hemaglutinação indireta e imunofluorescência indireta (IFI) qualitativo (1/40), confirmação por IFI quantitativa e exames parasitológicos e clínicos complementares.

Nos estudos sorológicos foram adotadas as orientações dispostas no Manual de Normas Técnicas do MS/FNS que preconiza dois testes qualitativos de diferentes princípios (BRASIL, 1994). Utilizamos a hemaglutinação indireta – HAI (IgG)- (kit Hemacruzi 96, Ref. 35.066, Biomérieux) e a imunofluorescência indireta (IFI) como teste padrão ouro de confirmação - (*kit* Imunocruzi, Biomérieux ref. 35051) com titulação de soros para a pesquisa de IgG e IgM anti-*T. cruzi*.

As diluições utilizadas nos dois testes foram de 1:20 até 1:1.280, e aceitáveis como soros reagentes, o *cut off* de 1:40 para os dois testes seguindo orientação do fabricante. Os procedimentos dos testes sorológicos encontram-se descritos nos Anexos 11 e 12.

4.6. IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE TRIPANOSSOMAS

4.6.1. Triatomíneos

A identificação dos triatomíneos obedeceu aos critérios taxonômicos de Lent & Wygodzinski (1979) e foi realizado no IEC. Os espécimes capturados foram levados para o laboratório, um terço deles sendo destinados à formação de colônias para estudos futuros e os restantes desinfectados individualmente em solução de Hibitane[®] (ICI) (Anexo 13). Em seguida, submetidos à compressão do abdome para retirada do conteúdo da ampola retal, que foi diluído em uma solução mista (Anexo 12) e examinado entre lâmina e lamínula, com objetiva 40x, para pesquisa de flagelados semelhantes a *T. cruzi*. Quando positivo, o material foi semeado em (6 tubos) de meio bifásico de cultura de Hoff's (DIFCO, Laboratories USA) e as culturas positivas transferidas para meio monofásico (RPMI 1640, Roswell Park Memorial Institute - Divisão de Antígenos, GIBCO Laboratories USA) e/ou LIT (Liver Infusion Tryptose) para crescimento, identificação e obtenção de extratos para caracterização dos parasitos. Os mesmos triatomíneos foram depois dissecados e, do material obtido, preparados esfregaços em lâminas e corados por Giemsa para identificação.

4.6.2. Mamíferos e humanos

Isolados de *T. cruzi* foram obtidos do sangue de mamíferos silvestres por punção intracardíaca, cultura direta do sangue e/ou após xenodiagnóstico e inoculação intraperitoneal em camundongos - com subsequente hemocultura em meio bifásico e/ou em meio monofásico (Anexo 9). Nos humanos o isolamento foi realizado com coleta de sangue por punção venosa e seguindo os procedimentos adotados por Miles, (1993): o sangue dos vertebrados foi diluído em salina fisiológica estéril, examinado em microscopia ótica para se detectar a presença de tripanossomase 0,1 ml semeado em cabine estéril nos meios citados para leitura com 3 semanas.

4.7. CRIOPRESERVAÇÃO DE TRIPANOSSOMAS.

Formas epimastigotas com crescimento de 1×10^6 parasitos por mm^3 contados em câmara de Neubauer foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute - Divisão de Antígenos) e/ou LIT na proporção de 1,8 ml do meio para 0,2 ml de glicerol em ampolas de poliestireno

apropriadas. Após homogeneização passam por 48 hs em temperatura de -20°C, uma semana em temperatura de -70°C e finalmente crio preservadas em nitrogênio líquido (Miles, 1993).

4.8. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE TRIPANOSSOMAS

4.8.1. Cultura e preparação de massa celular de tripanosomas.

Após descongelamento, os parasitos foram cultivados em tubos de ensaio de poliestireno estéreis e descartáveis com parede chata onde se acrescentava 0,1 ml de sobrenadante de cultura em 2 ml de meio de cultura RPMI 1640 e/ou LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado a 55°C. Quando os cultivos *in vitro* apresentarem crescimento exponencial de 1×10^6 parasitos por mm^3 contados em câmara de Neubauer (7 a 10 dias), o meio foi transferido para garrafas de cultura de 25 ml com o mesmo meio para a produção de massa parasitária. O cultivo foi realizado em 100 ml de meio suplementado com 5% de soro fetal bovino inativo, a 28°C, por 7 a 10 dias.

4.8.2. Extração de DNA genômico

Os parasitos foram sedimentados por centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos, lavados duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 nas mesmas condições de centrifugação e o sedimento ressuspenso em tampão de lise contendo 50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 50 mM de NaCl; 50 mM de EDTA e 1% de SDS. Proteinase K (Sigma) foi adicionada numa concentração final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e a suspensão incubada a 56°C por duas horas. O DNA foi purificado com extrações com fenol, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e com clorofórmio, todas em volumes iguais. Finalmente, o DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio 3,0 M pH 5,2. A solução assim obtida foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos e o sedimento lavado com etanol a 70%. O DNA assim extraído foi seco à temperatura ambiente e diluído em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH 8,0). A esta solução foram acrescentados 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNase e após duas horas feita nova extração fenólica e precipitação do DNA que foi guardado a -20°C até seu uso. A integridade do DNA extraído foi verificada por corrida em gel de agarose a 0,8% em TBE (0,09 M Tris-borato; 0,002 M EDTA pH 8,0). Alternativamente utilizou-se também para a extração o kit da **AMERSHAM PRODUTO 27-5237-01** obedecendo-se ao protocolo do fabricante.

4.8.3. Identificação e genotipagem dos isolados de *Trypanosoma sp.*

A identificação e genotipagem dos isolados foram realizadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-multiplex), segundo Fernandes *et al.* (2001). Esta reação amplifica

especificamente uma parte do espaçador não transcrito do gene de mini-exon que varia com as espécies de *Trypanosoma* (*T. cruzi* x *T. rangeli*) e com as linhagens de *T. cruzi*. Os fragmentos gerados variando entre 100 e 250 pares de bases. Os primers ou iniciadores utilizados nas reações de PCR apresentam as seguintes sequências:

TCI: (200 pb) (5'-ACACTTTCTGGCGCTGATCG)
TCII: (250 pb) (5'-TTGCTCGCACACTCGGCTGCAT)
Z3: (150 pb) (5'-CCGCGCACAAACCCCTATAAAAATG)
TR: (100 pb) (5'-CCTATTGTGATCCCCATCTTCG)
EXON: (5'-TACCAATATAGTACAGAACTG)

A reação é constituída por 100 pmol de cada iniciador, 150 μ M de dNTPs, num tampão de 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM de $MgCl_2$, 25 mM de KCl, 0,1 mg/mL de albumina bovina e 2,5 U de TaqDNA Polimerase. Aproximadamente 10 ng de DNA genômico foram acrescentados e as reações realizadas num volume final de 50 μ L com água Tipo I. O perfil térmico consistiu de um passo inicial de 5 minutos a 95°C, seguidos de 34 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Em cada reação de PCR foram utilizadas como controle as seguintes cepas de referência: TC1 X10 Clone 1, TC2 Cepa Y, Z3 Esmeraldo Clone 1 e *T. rangeli* R1625. As cepas de referência usadas foram fornecidas e caracterizadas pelo Laboratório de Doença de Chagas do Instituto Evandro Chagas (Miles *et al* 1981a,b; Fernandes *et al* 1998, 2001).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, a 100 volts por 1 hora. Após a eletroforese o DNA foi revelado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Para controle do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado um marcador molecular de 50 pares de base.

5. RESULTADOS

5.1. SURTOS E CASOS DE DCA IDENTIFICADOS E ESTUDADOS

As informações clínico-epidemiológicas dos surtos de DCA estudados em municípios do Pará e Amapá encontram-se sumarizadas no Quadro 3.

5.1.1. Surto de Barcarena

Na distribuição dos casos de DCA por sexo o surto acometeu 3 (25%) homens 9 mulheres (75%). Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição de casos de DCA por sexo no surto de Vila do Conde, Barcarena, PA – 2006

Sexo	Quantidade	%
Masculino	3	25
Feminino	9	75
Total	12	100

Quadro 2. Informações clínico-epidemiológicas dos surtos de DCA estudados em municípios do Pará e Amapá.

Municípios	Características dos surtos de DCA por Município			
	Barcarena	Belém	C. do Arari	Santana
Perfil Clínico-Epidemiológico				
Períodos de adoecimento	28/09 a 01/10/06	04/07 a 11/08/06	06/08 a 30/08/06	04/12 a 19/12/04
Nº de pessoas atingidas	12	12	12	27
Provável via de transmissão	Oral	Oral	Oral	Oral
Casos/população local	12/1630	12/2188	12/680	27/676
Sexo				
Masculino	3	5	5	14
Feminino	9	7	7	13
Idade				
01-10	1	1	2	9
11-20	1	1	5	9
21-30	2	0	3	8
31-40	4	3	0	1
41-50	1	2	1	0
51-70	3	5	1	0
Sinais e sintomas				
Febre	12	12	12	27
Cefaléia	12	6	11	18
Mialgias	12	5	11	20
Edema de face	9			12
Palidez	9	6	6	17
Dor abdominal	8	1	5	16
Dispnéia	7	2	7	13
Edema de MMII	7	3	1	12
Exantema	5	1		5
Hepatomegalia	5		2	2
Palpitações	4			
Esplenomegalia	4			
Adenomegalia	2			1
Edema generalizado	2			3
Cardite	1			11
Icterícia	1			
Tosse	1	1	2	
Lipotímia	1			
Astenia		6		
Calafrio		4		
Anorexia		2		
Artralgia		2		19
Diarréia		2		1
Eritema difuso doloroso		2		
Vômito		2		2
Dor epigástrica		1		
Dor precordial		1		
Odinofagia		1		
Dor lombar		1		
Edema bpalpebral		1		
Miocardiopatia		1		
Nódulos eritematosos		1	1	
Nodulações dolorosas de MMII				2
Dados laboratoriais				
GE	6	9	6	4
QBC	11	10	11	11
Xenodiagnóstico	11	12	11	16
Hemocultura	10	10	10	11
HAI	12	12	12	27
IFI-IgG	12	12	12	27
IFI-IgM	12	11	12	27

Quanto a distribuição dos casos por faixa etária os casos de DCA acometeram pessoas entre 7 e 70 anos (um paciente em cada uma das idades) com maior predominância de ocorrência entre 37 e 47 anos (3 casos) e 7 casos distribuídos nas demais faixas etárias como vistos na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição de casos de DCA por faixa etária surto de Vila do Conde Barcarena, PA - 2006

Faixa etária	Quantidade	%
7 - 17	2	17
18 - 27	2	17
28 - 37	1	8
38 - 47	3	25
48 - 57	2	17
58 - 70	2	17
Total	12	100

Os pacientes apresentaram adoecimento entre os dias 28 de setembro e 01/10/2006, com um maior número de pacientes (4) doentes no dia 01/10 a distribuição pode ser visualizada na Tabela 6..

Tabela 6. Distribuição dos casos de acordo com os dias e meses no surto de DCA em Vila do Conde, Barcarena, PA – 2006

Dias e Meses	Quantidade	%
18 Set.	1	8
21 Set.	2	17
22 Set.	2	17
23 Set.	1	8
25 Set.	1	8
28 Set.	2	17
1 Out.	3	25
Total	12	100

Os pacientes deste surto apresentaram uma exuberância de sintomas em que todos apresentaram febre, cefaleia e mialgia. Nove pacientes apresentaram edema de face e palidez, oito dor abdominal, sete tiveram dispnéia e edema de membros inferiores, cinco apresentaram exantema e hepatomegalia; quatro apresentaram palpitações e esplenomegalia demais sintomas como cardite, icterícia, tosse e lipotimia acometeu um paciente Tabela 7.

Tabela 7. Frequência dos sinais e sintomas observados no surto de DCA em Vila do Conde, Barcarena, PA – 2006

Sinais e Sintomas	Frequência
Febre	12
Cefaleia	12
Mialgias	12
Edema de face	9
Palidez	9
Dor abdominal	8
Dispnéia	7
Edema de MMII	7
Exantema	5
Hepatomegalia	5
Palpitações	4
Esplenomegalia	4
Adenomegalia	2
Edema generalizado	2
Cardite	1
Icterícia	1
Tosse	1
Lipotímia	1

Os resultados dos exames parasitológicos apresentaram sensibilidade de 91,7% (11/12) cada para QBC e xenodiagnóstico, enquanto que na hemocultura a positividade foi de 83,3% (10/12) e na gota espessa a positividade foi de 50% (6/12). Para os exames sorológicos houve uma positividade de 100% (12/12) para todos os testes aplicados (HAI, IFIgG e IFIgM). (Tabela 85).

Tabela 8. Resultados exames laboratoriais observados no surto de DCA em Vila do Conde, Barcarena, PA – 2006

Exames realizados (n=12)	Positivo	Negativo	%Positivo
GE	6	6	50
QBC	11	1	91,7
XENO	11	1	91,7
HEMO	10	2	83,3
HAI	12	0	100
IFIgG	12	0	100
IFIgM	12	0	100

5.1.2. Surto de Belém

No grupo de Belém a distribuição dos casos de DCA por sexo o surto acometeu 5 mulheres (42%) homens e 7 homens (58%). Tabela 9.

Tabela 9. Distribuição de casos de DCA por sexo surto de Belém, PA – 2003

Sexo	Quantidade	%
Feminino	5	42
Masculino	7	58
Total	12	100

Por outro lado, a distribuição dos casos de DCA por faixa etária no surto de Belém a doença acometeu um grupo que apresentava idade entre 5 e 60 anos, com predominância na faixa entre 30 e 39 anos, conforme se visualiza na Tabela 10.

Tabela 10. Distribuição de casos de DCA por faixa etária surto de Belém, PA – 2003

Faixa etária	Quantidade
05 – 09	1
10 – 19	1
20 – 29	4
30 – 39	3
40 – 59	2
60 >	1
Total	12

O adoecimento dos pacientes ocorreu entre os dias 4/7/2006 e 11/8/2006, com maior número de pacientes (3) doentes no dia 11/8. A distribuição pode ser visualizada na Tabela 11.

Tabela 11. Distribuição dos casos de acordo com os dias e meses no surto de DCA em Belém, PA – 2003

Data	Quantidade
4 Jul.	1
13 Jul.	1
22 Jul.	1
24 Jul.	2
27 Jul.	1
29 Jul.	1
6 Ago.	2
11 Ago.	3
Total	12

Os pacientes deste surto apresentaram sintomatologia associada, sobretudo, com febre em todos os pacientes, além de outros sintomas importantes como cefaleia e palidez em seis pacientes e mialgia em cinco. Calafrios ocorreram em 4 pacientes. Os demais sintomas ocorreram com uma menor frequência. (Tabela 12).

Tabela 12. Frequência dos sinais e sintomas observados no surto de DCA de Belém, PA - 2003

Sintomas observados	Frequência	%
Febre	12	100
Astenia	6	50
Cefaleia	6	50
Palidez	6	50
Mialgia	5	42
Calafrio	4	33
Edema de Ml	3	25
Anorexia	2	17
Artralgia	2	17
Diarréia	2	17
Dispnéia	2	17
Eritema difuso doloroso	2	17
Vômito	2	17
Exantema dos Ml	1	8
Dor epigástrica	1	8
Dor precordial	1	8
Dor abdominal	1	8
Odinofagia	1	8
Dor lombar	1	8
Edema bi palpebral	1	8
Miocardiopatia	1	8
Nódulos eritematosos	1	8
Tosse seca	1	8

Em relação aos resultados dos exames parasitológicos apresentaram positividade de 83,33% (10/12) para QBC e hemocultura, 100% (12/12) para o xenodiagnóstico e 75%, (9/12) para a gota espessa. Para os exames sorológicos houve uma positividade de 100% (12/12) para HAI e IFIgG e de 91,66% (11/12) para IFIgM. (Tabela 13).

Tabela 13. Resultados exames laboratoriais observados no surto de DCA em Belém, PA – 2003

Exames realizados (n=12)	Positivo	Negativo
GE	9	3
QBC	10	2
XENO	12	0
HEMO	10	2
HAI	12	0
IFlgG	12	0
IFlgM	11	1

5.1.3. Surto de Cachoeira do Arari

No surto de Cachoeira do Arari a distribuição dos casos de DCA por surto foi a seguinte: 5 acometendo pessoas do sexo feminino e 7 do sexo masculino. (Tabela 14).

Tabela 14. Distribuição de casos de DCA por sexo surto de Cachoeira do Arari, PA – 2006

Sexo	Quantidade	%
Feminino	5	42
Masculino	7	58
Total	12	100

A faixa etária dos pacientes deste surto variou entre 1 a 59 anos sem predominância em nenhuma delas. (Tabela 15).

Tabela 15. Distribuição de casos de DCA por faixa etária surto Cachoeira do Arari, PA – 2006

Faixa etária	Quantidade
01 – 09	1
10 – 14	3
15 – 19	3
20 – 29	3
30 – 59	2
Total	12

O adoecimento das pessoas neste surto ocorreu entre os dias entre os dias 18/09/06 e 01/10/06. O maior número de pessoas, seis no total adoeceram entre os dias 19 e 21/09/06. Num único dia 01;10/2006 3 pessoas iniciaram os sintomas e procuraram o Ambulatório do IEC para atendimento. (Tabela 16).

Tabela 16. Distribuição dos casos de acordo com os dias e meses no surto de DCA em Cachoeira do Arari, PA - 2006

Dias e Meses	Quantidade
06 Ago.B	1
11 Ago.	2
17 Ago.	2
18 Ago.	1
20 Ago.	1
24 Ago.	2
30 Ago.	3
Total	12

Os principais sintomas observados durante este surto foram: febre (em 12 pacientes), cefaleia e mialgia (em 11), dispnéia (em 7) e palidez (em 6). Demais sintomas apresentados na tabela abaixo se distribuíram em menor intensidade entre os pacientes. (Tabela 17).

Tabela 17. Frequência dos sinais e sintomas observados no surto de Cachoeira do Arari, PA - 2006

Sinais e Sintomas	Frequência	%
Febre	12	100
Cefaleia	11	91,6
Mialgia	11	91,6
Dispnéia	7	58,3
Palidez	6	50
Dor abdominal	5	41,6
Hepatomegalia	2	16,7
Tosse seca	2	16,7
Edema de MI	1	8,3
Nódulos eritematosos	1	8,3

Nos exames parasitológicos aplicados nos pacientes deste surto as maiores taxas de positividade foram o QBC e o xenodiagnóstico que apresentaram 91,7% (11/12). A hemocultura foi positiva em 83,3% (10/12) dos pacientes e a gota espessa em 50% (6/12). Para os exames sorológicos HAI, IFIgG e IFIgM todas foram 100% positivas. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados exames laboratoriais observados no surto de DCA em Cachoeira do Arari, PA – 2006

Exames realizados (n=12)	Positivo	Negativo	%Positivo
GE	6	6	50
QBC	11	1	91,7
XENO	11	1	91,7
HEMO	10	2	83,3
HAI	12	0	100
IFIgG	12	0	100
IFIgM	12	0	100

5.1.4. Surto de Santana, (AP)

O surto de Santana foi o que acometeu o maior número de pessoas estudadas neste trabalho. Treze foram do sexo feminino e 14 do sexo masculino como vistos na Tabela 19.

Tabela 19. Distribuição de casos de DCA por sexo no surto de Igarapé da Fortaleza, Santana, AP – 2004

SEXO	Quantidade	%
Feminino	13	46
Masculino	14	54
Total	27	100

Este surto teve uma característica diferente dos demais surtos quanto à faixa etária. A doença ocorreu num grupo de pessoas jovens. Somente entre a faixa de 1 a 18 anos foram dezenove pacientes e na faixa de 19 a 31 anos a doença acometeu 8 pessoas. (Tabela 20).

Tabela 20. Distribuição de casos de DCA por faixa etária no surto de Igarapé da Fortaleza, Santana, AP – 2004

Faixa etária	Quantidade	%
1 - 5	4	15
6 - 11	7	26
12 - 18	8	30
19 - 24	2	7
25 - 31	6	22
Total	27	100

O período de adoecimento neste grupo de pessoas também foi diferente. Aqui ocorreu um agrupamento de pacientes num espaço bem curto de tempo como 4 a 19/12/2004, sendo que no dia 8/12/2004 foi aquele em que mais os pacientes se queixaram dos primeiros sintomas e procuraram Postos de Saúde local para atendimento. (Tabela 21).

Tabela 21. Distribuição dos casos de acordo com os dias e meses no surto de Igarapé do Fortaleza, Santana, AP – 2004

Dias e Meses	Quantidade
4 Dez.	1
6 Dez.	1
7 Dez.	1
10 Dez.	3
11 Dez.	2
13 Dez.	8
14 Dez.	1
15 Dez.	5
16 Dez.	4
19 Dez.	1
Total	27

A febre foi o principal sintoma aparecendo em todos os 27 pacientes. Mialgias, artralguas, cefaleia e palidez ocorreram respectivamente entre 20, 19, 18 e 17 pacientes. Dor abdominal, dispnéia, edema de face e de membros inferiores ocorreram também entre 40 e 50% dos pacientes. Outros sintomas ocorrentes são apresentados na tabela abaixo. (Tabela 22).

Tabela 22. Frequência dos sinais e sintomas observados no surto de Igarapé do Fortaleza, Santana, AP – 2004

Sinais e Sintomas	Frequência	%
Febre	27	100,00
Mialgias	20	74,07
Artralgia	19	70,37
Cefaleia	18	66,66
Palidez	17	62,96
Dor abdominal	16	59,25
Dispnéia	13	48,14
Edema de face	12	44,44
Edema de MMII	12	44,44
Cardite	11	40,74
Exantema	5	18,51
Edema generalizado	3	11,11
Hepatomegalia	2	7,40
Vômitos	2	7,40
Nodulações Dolorosas MMII	2	7,40
Diarréia	1	3,70
Adenomegalia	1	3,70

O perfil dos exames parasitológicos observados nos pacientes deste surto revelou que o xenodiagnóstico apresentou a maior positividade 59,3% (16/27); a hemocultura apresentou positividade de 40,8% (11/27) e a gota espessa 14,9% (4/27). Quanto aos exames sorológicos HAI, IFIgG e IFIgM todas foram 100% positivas. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 23.

Tabela 23. Resultados exames laboratoriais observados no surto de DCA em Igarapé do Fortaleza, Santana, AP - 2004

Exames realizados (n=27)	Positivo	Negativo	%Positivo	%Negativo
GE	4	23	14,9	85,1
QBC	5	22	18,5	81,5
XENO	16	11	59,3	40,7
HEMO	11	16	40,8	59,2
HAI	27	0	100	0
IFlgG	27	0	100	0
IFlgM	27	0	100	0

5.2. PESQUISA PARASITOLÓGICA DE *T. CRUZI* NOS PACIENTES, PARENTES, VIZINHOS E CONTATOS ASSOCIADOS AOS SURTOS

Durante as investigações dos surtos de DC selecionados, a pesquisa de *T. cruzi* no sangue foi realizada pelos métodos de gota espessa, QBC[®], xenodiagnóstico e hemocultura. Foram examinados 151 indivíduos, incluindo aqueles que apresentavam indicação clínica (n=63) e seus familiares diretos e/ou vizinhos com possível associação com os surtos. Todos os indivíduos que eram pacientes dos surtos (63/151 – 41,72%) apresentaram um ou mais testes parasitológicos positivos. (Tabela 24).

Tabela 24. Porcentual de positividade de testes parasitológicos aplicados ao diagnóstico de 63 pacientes com DCA em Belém, Barcarena e Cachoeira do Arari (PA) e em Santana (AP) – 2003 – 2007.

EXAMES	BARCARENA N=12	BELEM N=12	C. DO ARARI N=12	SANTANA N=27	TOTAL /%
GE	6	8	8	4	26/41,26
QBC	11	9	12	5	37/58,73
Xeno	11	12	11	16	50/79,36
Hemo	10	9	9	11	39/61,90

Quando comparados, os resultados dos 4 testes parasitológicos aplicados nos 63 pacientes com sintomatologia clínica de doença de Chagas aguda apresentaram diferentes níveis de sensibilidade: 41,3% (26/63) no exame de gota espessa; 58,7% (37/63) no QBC[®]; 79,4% (50/63) no xenodiagnóstico e 61,9% (39/63) na hemocultura (Tabela 25).

Tabela 25. Pesquisa parasitológica em surtos de doença de Chagas em comunidades dos municípios de Barcarena, Belém, Cachoeira do Arari (PA) e Santana (AP) com ocorrência de surtos de DCA, 2004 – 2007.

Município	¹ Pop. Estudada	Nº Casos	² GE	³ QBC	⁴ Xeno	⁵ Hemo
			+(%)	+(%)	+(%)	+(%)
Barcarena	52	12	6(50)	11(91,7)	11(91,7)	10(83,3)
Belém	46	12	8(67)	9(75)	12(100)	9(75)
C. do Arari	26	12	8(66,7)	12(100)	11(91,7)	9(75)
Santana	27	27	4(14,81)	5(18,5)	16(59,2)	11(40,74)
Total	151	63	26(41,3)	37(58,7)	50(79,4)	39(61,9)

¹Familiares diretos e/ou vizinhos com possível associação com o surtos; ²Gota espessa; ³Quantitative Buffy Coat; ⁴Xenodiagnóstico; ⁵Hemocultura.

5.3. ESTUDO SOROLÓGICO DAS POPULAÇÕES ASSOCIADAS AOS SURTOS

A pesquisa sorológica abrangeu uma amostragem de 2.648 pessoas nos quatro municípios estudados. Os resultados alcançados pelo teste de triagem por hemaglutinação indireta (HAI) identificaram inicialmente 3,05% (81/2648) dos indivíduos sorologicamente reagentes. Posteriormente, quando as amostras passaram pelos testes de confirmação de IFI quantitativa, para a pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi*, a positividade foi de 2,49% (66/2.648) para IgG e 2,37 (63/2.648) para IgM. Os resultados detalhados dos estudos sorológicos realizados por município encontram-se na tabela 26. Para estabelecer um caso positivo utilizamos os critérios estabelecidos no Consenso Brasileiro de Doença de Chagas: exame parasitológico positivo e/ou duas técnicas sorológicas de diferentes princípios com IgM positivo e clínica compatível de fase aguda (BRASIL, 2005).

Tabela 26. ¹Pesquisa sorológica para anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em comunidades dos municípios de Barcarena, Cachoeira do Arari e Santana com ocorrência de surtos de DCA, 2004 – 2007.

Município	Pop. IBGE	Casos (n)	² Pop.Local/ % infectados	Amos. Calc./ Estudada	³ HAI	⁴ IF-IgG	⁵ IF-IgM
	Município				Exa/+(%)	Exa/+(%)	Exa/+(%)
Barcarena	102.015	12	1630 (0,73)	93/1230	1230/16 (1,3)	1230/11 (0,9)	1230/12(0,97)
Belém	1.437.000	12	2188 ((0,54)	196/436	436/14 (3,21)	436/12 (2,75)	436/12 (2,75)
C. do Arari	117.127	12	680 (1,76)	65/546	546/19 (3,5)	546/12 (2,19)	546/12 (2,19)
Santana	100.924	27	676 (3,99)	88/436	436/32 (7,3)	436/28 (6,42)	436/27 (6,19)
Total	1.757.066	63	5174(1,21)	442/2648	2648/81(3,05)	2648/66(2,49)	2648/63(2,37)

¹Triagem por hemaglutinação indireta e imunofluorescência indireta (IFI) qualitativo (1/40), confirmação por IFI quantitativa e exames complementares; ²Amostragem nas comunidades com possível associação com o surtos; ³Hemaglutinação Indireta; ⁴Imunofluorescência Indireta globulina G; ⁵Imunofluorescência Indireta globulina M.

Não foi observado nenhum teste sorológico ou parasitológico positivo nas populações humanas das áreas estudadas em São Luís, Maranhão.

5.4. ESTUDO DE RESERVATÓRIOS

5.4.1. Captura e identificação de mamíferos

A fim de investigar os reservatórios e ciclos enzoóticos de transmissão de *T. cruzi* nos locais de ocorrência dos surtos selecionados no Pará e Amapá foram realizadas capturas de animais do peridomicílio e silvestres entre os anos de 2004 e 2007 no período mais próximo da ocorrência dos surtos, com exceção do surto de Belém, ocorrido em área urbana e sem possibilidades de captura. No ambiente silvestre foram capturados 24 mamíferos, 22 da ordem Didelphimorpha (Marsupialia) (3 espécies) e 2 da ordem Rodentia (três espécies). Da Ordem Didelphimorpha foram capturados 13 exemplares de *Didelphis marsupialis*, 5 *Philander opossum*, três *Metachirus nudicaudatus* e 1 de *Marmosa cinerea*. Da Ordem Rodentia, foram capturados 1 *Oryzomys macconnelli*, 1 *Oecomys bicolor* e 433 *R. rattus* (estes capturados em ambiente doméstico). (Tabela 27).

A distribuição de captura por localidade foi a seguinte: em Barcarena foram capturados 16 animais, Cachoeira do Arari 4, em Santana 4 e em São Luís (onde não teve surto de doença de Chagas) foram capturados 451 animais.

5.4.2. Exames parasitológicos

Tabela 27. Mamíferos capturados e taxa de infecção para *Trypanosoma cruzi* nos Municípios de Barcarena e C. do Arari (PA), Santana (AP) e São Luís (MA), 2004 – 2007.

Localidades	Barcarena		C. do Arari		Santana		São Luís	
	Cap/Exa	Pos(%)	Cap/Exa	Pos(%)	Cap/Exa	Pos(%)	Cap/Exa	Pos(%)
Didelphimorpha								
<i>D. marsupialis</i>	9/9	5(55,5)	4/4	4(100)	1/1	1(100)	9/9	4(44,4)
<i>P. opossum</i>	4/4	0(0/0)	—	—	—	—	—	—
<i>M. nudicaudatus</i>	3/3	1(33,3)	—	—	—	—	—	—
<i>M. cinerea</i>	—	—	—	—	1/1	1(100)	—	—
Rodentia								
<i>O. macconnelli</i>	—	—	—	—	1/1	1(100)	—	—
<i>O. bicolor</i>	—	—	—	—	1/1	1(100)	—	—
<i>R. rattus</i>	—	—	—	—	—	—	442/373	11(2,9)
Total	16/16	6(37,5)	4/4	4(100)	4/4	4(100)	451/382	15(3,9)

Um total de 475 animais foi capturado, e a taxa global de infecção foi de 7,14% (29/406). Em São Luís, localidade que não ocorreu surto de doença de Chagas, foi coletada em domicílios e seus anexos apenas a espécie *R. rattus* com um total de 442 capturados e uma taxa de infecção de 2,9% (11/373). Em ambiente silvestre foram coletados 9 exemplares de *D. marsupialis* todos positivos para pesquisa de tripanossomatídeos (Tabela 28).

Os resultados dos testes parasitológicos aplicados nos estudos parasitológicos animais foi a seguinte:

Gota espessa: A taxa de positividade foi de 2,21% (9/406). Quando se examinou a espécie *D. marsupialis* separadamente obteve-se 22,72% (5/22) de positividade com infecção para tripanossomatídeos.

QBC®: a positividade geral apresentada foi de 5,15% (21/406). Entre os mamíferos, a principal taxa de infecção com tripanossomas identificada foi de 63,63% (14/22) em *D. marsupialis* (7/13).

Xenodiagnóstico: a taxa de infecção geral neste método foi de 5,65% (23/406) enquanto que a positividade entre as espécies foi de 81,8% (18/22) dos *D. marsupialis* e 100% (1/1) da *M. cinerea*, *O. macconnelli* e *Oecomys bicolor* (1 exemplar de cada).

Hemocultura: com esta metodologia a taxa geral de infecção para tripanossomatídeos foi de 68,1% (15/22) para *D. marsupialis*; *M. cinerea*, *O. macconnelli* e *O. bicolor* 100% (3/3) e *M. nudicaudatus* 33,3% (1/3).

Tabela 28. Presença de *Trypanosoma cruzi* em mamíferos silvestres coletados nos Municípios de Barcarena e C. do Arari (PA), Santana (AP) e São Luís (MA), 2004 – 2007.

Hospedeiro	Nº animais Cap/Exa	Gota espessa		QBC®		Xenodiagnóstico		Hemocultura	
		Pos	%Pos	Pos	%Pos	Pos	%Pos	Pos	%Pos
Didelphimorpha									
<i>D. marsupialis</i>	22/22	05	22,72	14	63,3	18	81,8	15	68,1
<i>M. cinerea</i>	01/01	0	0	0	0	01	100	01	100
<i>P. opossum</i>	05/05	0	0	0	0	01	20	01	20
<i>M. nudicaudatus</i>	03/03	0	0	0	0	01	33,3	01	33,3
Rodentia									
<i>O. macconnelli</i>	01/01	0	0	0	0	01	100	01	100
<i>O. bicolor</i>	01/01	0	0	0	0	01	100	01	100
<i>R. rattus</i>	442/373	4	1,07	7	1,87	6	1,6	5	1,34
Total de animais	475/406	9	2,21	21	5,15	23	5,65	25	6,14

5.5. LEVANTAMENTO DE TRIATOMÍNEOS NOS LOCAIS DOS SURTOS

5.5.1. Estudo com triatomíneos em palmeiras, armadilhas de luz e outros ecótopos

Foram capturados nas localidades estudadas 3.279 triatomíneos distribuídos nas espécies: *T. rubrofasciata* ($n=3.008$) (única espécie domiciliar coletada em São Luís (MA) sendo que somente 128 exemplares tiveram condições de examinar e observada taxa de infecção de 30,46%, (39/128) e as silvestres *R. robustus* ($n=137$), *R. pictipes* ($n=94$), *E. mucronatus* ($n=6$), *R. neglectus* ($n=5$) *P. geniculatus* ($n=12$) e *P. lignarius* ($n=6$).

5.5.1.1. Triatomíneos coletados em palmeiras

Foram examinadas 115 palmeiras de 5 espécies diferentes. O urucurizeiro, *Schelea martiana*, representou 36,52% (42/115) das examinadas; babaçu, *Orbignya speciosa*, 20,85% (24/115); inajazeiro, *Maximiliana regia*, 18,26% (21/115); dendêzeiro, *Elaeis melanococca*, 13,91% (16/115) e bacabeira, *Oenocarpus bacaba*, 10,43% (12/115) (Tabela 29).

A taxa de infestação de triatomíneos nas 5 espécies de palmeiras foi de 54,76% (23/42) na *S. martiana*; 66,66% (16/24) na *O. speciosa*; 76,19% (9/16) para *M. regia*; 56,25% (9/16) para *E. melanococca*; e 50% (6/12) para *O. bacaba*.

As palmeiras regionais (Figura 4, Tabela 29) foram os principais ecótopos das 6 espécies de triatomíneos silvestres capturadas. O urucurizeiro (*S. martiana*) apresentava infestação de 47,41% (101/213) dos triatomíneos; o inajazeiro (*M. regia*) 35,21% (75/213); o babaçueiro (*O. speciosa*) 5,16% (11/213); o dendêzeiro (*E. melanococca*) 1,87% (4/213) e a bacabeira (*O. bacaba*) 10,32% (22/213).

Tabela 29. Palmeiras regionais examinadas com presença de triatomíneos nos municípios de Barcarena, Cachoeira do Arari (PA), Santana (AP) e São Luís (MA) período de 2004 a 2007.

ESPÉCIE DE PALMEIRA	Exa/%	Pos/%	Triatomíneos coletados						¹Total (%)
			E. muc	P. gen	P. lig	R. neg	R. pic	R. rob	
<i>S. martiana</i> (Urucurizeiro)	42/36,52	23/54,76	6	—	1	—	41	53	101 (47,41)
<i>M. regia</i> (Inajazeiro)	24/20,85	16/66,66	—	2	—	—	27	46	75 (35,21)
<i>O. speciosa</i> (Babaçueiro)	21/18,26	16/76,19	—	—	—	5	—	6	11 (5,16)
<i>E. melanococca</i> (Dendêzeiro)	16/13,91	9/56,25	—	—	—	—	—	4	4 (1,87)
<i>O. bacaba</i> (Bacabeira)	12/10,43	6/50	—	—	—	—	10	12	22 (10,32)
Total Geral	115	70/60,86	6	2	2	5	78	121	214(100)

E. muc: *Eratyrus mucronatus*; **P.gen:** *Panstrongylus geniculatus*; **P. lig:** *Panstrongylus lignarius*; **R. neg:** *Rhodnius neglectus*; **R. pic:** *Rhodnius pictipes*; **R. rob:** *Rhodnius robustus*.

¹Total válido somente para as espécies de triatomíneos coletados.

O número de triatomíneos silvestres coletados em ordem decrescente nos municípios de Cachoeira do Arari, Barcarena e Santana foi respectivamente, 154, 62 e 50.

5.5.1.2. Triatomíneos capturados em armadilhas de luz

Um total de 255 triatomíneos silvestres de cinco espécies foi capturado nas armadilhas luminosas nos municípios de Barcarena e Cachoeira do Arari e Santana: *R. robustus* 53,72% (137/255) *R. pictipes* 38,86% (94/255), *P. geniculatus* 4,7% (12/255), *P. lignarius* e *E. mucronatus* 2,35% em cada (6/255).

Vinte e cinco triatomíneos das espécies *R. pictipes* e *R. robustus* foram coletados por moradores em comunidades dos municípios de Barcarena, Cachoeira do Arari e Santana em diferentes ecótopos, inclusive insetos adultos no peridomicílio e dentro das casas.(Tabela 30)

Tabela 30. Triatomíneos capturados com armadilha de luz e taxa de infecção para *T. cruzi* nos municípios de Barcarena e C. do Arari (PA) e Santana (AP) entre 2004 e 2007

Localidades	Barcarena		C. do Arari		Santana		Total	
	Cap/Exa	Pos(%)	Cap/Exa	Pos(%)	Cap/Exa	Pos(%)	Cap/Exa	Pos(%)
<i>E. mucronatus</i>	2/2	1(50)	4/0	0(0)	—	—	6/2	1(50)
<i>P. lignarius</i>	4/0	—	1/1	0(0)	1	—	6/1	0(0)
<i>P. geniculatus</i>	12/2	1(50)	—	—	—	—	12/2	1(50)
<i>R. pictipes</i>	14/14	7(50)	30/27	24(88,8)	49/45	18(40)	94/86	49(56,9)
<i>R. robustus</i>	28/26	17(65,3)	111/78	62(79,4)	—	—	137/104	79(76,0)
Total	60/44	26(59)	146/106	86(81,1)	50/45	18(40)	255/195	130(67,0)

5.6. PESQUISA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM TRIATOMÍNEOS

A taxa de infecção global para pesquisa de tripanossomatídeos no conteúdo intestinal dos triatomíneos silvestres foi de 67% (130/195). Entre as espécies silvestres a taxa de infecção foi de 76% para *R. robustus* (79/104) e 56,9% para *R. pictipes* (49/86). *E. mucronatus* e *P. geniculatus* tiveram os mesmos índices de infecção, 50% (1/2) e 0% (0/1).

A distribuição dos índices de infecção entre os municípios trabalhados foi de 59% (26/44) em Barcarena; 81,1% (86/106) em Cachoeira do Arari e 40% (18/45) em Santana.

5.7. ISOLAMENTO EM CULTURA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS DOS CASOS HUMANOS, DE ANIMAIS E DE TRIATOMÍNEOS

Foram obtidos 46 isolados de tripanossomas de origem humana sendo 5 de Barcarena (PA), 12 de Belém, 12 de Cachoeira do Arari (PA) e 17 de Santana (AP). Não ocorreu isolamento de humanos em São Luís (MA)., Tabela 31.

Das amostras de mamíferos foi possível obter 29 isolamentos nas seguintes espécies: 14 de *Didelphis marsupialis*, 9 *R. rattus*, 2 *M. nudicaudatus*, 1 *M. cinerea*, 1 de *P. opossum*, 1 *O. bicolor* e 1 *O. macconnelli*. A origem dos isolamentos apresentou a seguinte distribuição geográfica: 17 mamíferos em São Luís, 7 em Barcarena, 4 mamíferos em Santana (AP) e 3 em Cachoeira do Arari.

Dos triatomíneos foi isolado um total de 74 amostras a partir das seguintes procedências: 35 de Cachoeira do Arari, 26 de São Luís, 7 amostras de Barcarena e 6 de Santana.

5.8. GENOTÍPAGEM DOS ISOLADOS DE *T. CRUZI*

Na genotipagem do gene de mini-exon, todos os isolados (homem, animais e triatomíneos) apresentaram o perfil de *T. cruzi* I (TCI) como descritos nas figuras 12 e 13 e Quadro 2.

Tabela 31. Isolados de tripanossomatídeos obtidos durante os estudos em Barcarena e Cachoeira do arari (Pará), Santana (Amapá) e São Luís (Maranhão) 2004 – 2007.

MUNICÍPIO	HOMEM	MAMÍFEROS	TRITOMÍNEOS
	Isol./Pos./ <i>T. cruzi</i>	Isol./Pos.vol/ <i>T. cruzi</i>	Isol./Pos./ <i>T. cruzi</i>
Santana (AP)	17/27/TCI	4/4/TCI	6/18/TCI
Belém	12/12/TCI	—	—
C. do Arari (PA)	12/12/TCI	3/4/TCI	35/86/TCI
Barcarena (PA)	5/12/TCI	7/16/TCI	7/26/TCI
São Luís (MA)	—	15/22	26/39/TCI
Total	46/51/TCI	29/46/TCI	74/169/TCI

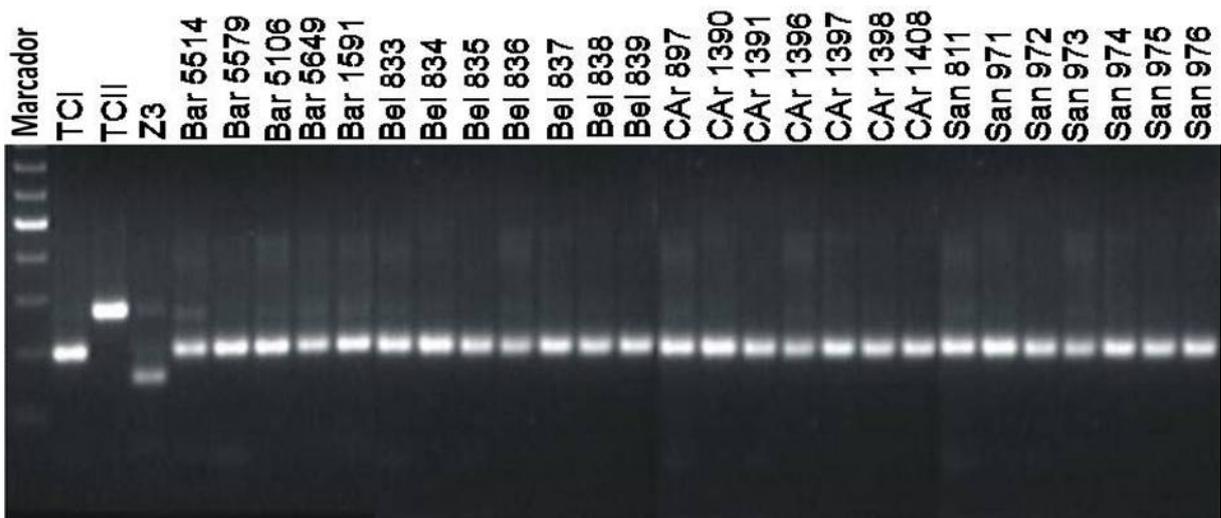


Figura 12. Marcador com 50 pb. Genotipagem pelo gene de mini-exon de isolados de humanos; Padrões de *T. cruzi*: TCI, TCII e Z3; Isolados de Barcarena - Bar 5514, 5579, 5106, 5849 e 1591; Isolados de Belém – Bel 833, 834, 835, 836, 837, 838 e 839; Isolados de Cachoeira do Arari – CAr 897, 1390, 1391, 1396, 1397, 1398 e 1408; Isolados de Santana – San 811, 971, 972, 973, 974, 975 e 976.

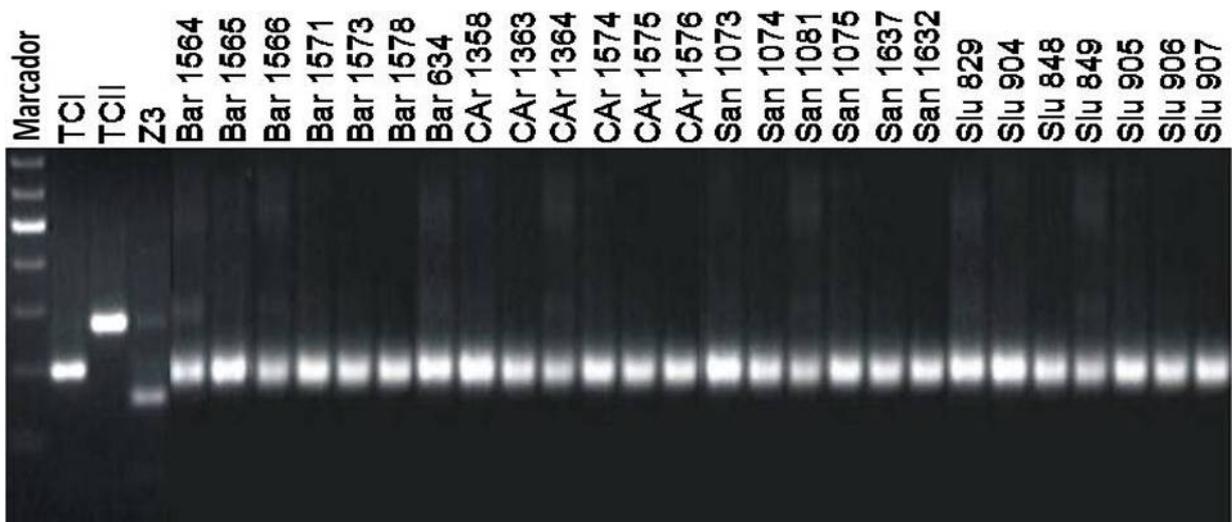


Figura 13. Marcador com 50 pb. Genotipagem pelo gene de mini-exon de isolados de humanos; Padrões de *T. cruzi*: TCI, TCII e Z3; Isolados de Barcarena - Bar 1564, 1565, 1566, 1571, 1573, 1578, 634; Isolados de Cachoeira do Arari – CAr 1358, 1363, 1364, 1574, 1575 e 1576; Isolados de Santana – San 1073, 1074, 1081, 1075, 1637, 1632; Isolados de São Luís – Slu 829, 904, 848,849, 905,906 e 907.

Quadro 3. Isolamento e caracterização de tripanossomatídeos pelo gene de mini-exon obtidos nos estudos em Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari (pará), Santana (Amapá) e São Luís (Maranhão) 2004 – 2007.

<i>Isolados</i>	Trycc/TCC	Hospedeiro	Origem geográfica	Tipagem
<i>T. cruzi 833</i>	833	Homem	Bélem (PA)	TC I
<i>T. cruzi 834</i>	834	Homem	Bélem (PA)	TC I
<i>T. cruzi 835</i>	835	Homem	Bélem (PA)	TC I
<i>T. cruzi 836</i>	836	Homem	Bélem (PA)	TC I
<i>T. cruzi 837</i>	837	Homem	Bélem (PA)	TC I
<i>T. cruzi 838</i>	838	Homem	Bélem (PA)	TC I
<i>T. cruzi 839</i>	839	Homem	Bélem (PA)	TC I
<i>T. cruzi 840</i>	840	Homem	Belém (PA)	TC I
<i>T. cruzi 841</i>	841	Homem	Bélem (PA)	TC I
<i>T. cruzi 842</i>	842	Homem	Bélem (PA)	TC I
<i>T. cruzi 843</i>	843	Homem	Bélem (PA)	TC I
<i>T. cruzi 811</i>	811	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi DRS</i>	971	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi LPSP</i>	972	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi MPR</i>	973	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi JSP</i>	974	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi XE6838/3</i>	975	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi XE6835/3</i>	976	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi XE6834/3</i>	977	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi XE6823/3</i>	978	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi XE 6821/4</i>	979	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi RAR</i>	1071	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi GRS</i>	1072	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi 812</i>	812	Homem	Santana (AP)	TC I
RBS 3081 5202	1435	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi JSA</i>	1086	Homem	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi BUG5306</i>	1073	<i>R. pictipes</i>	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi BUG5319</i>	1074	<i>R. pictipes</i>	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi BUG5326</i>	1081	<i>R. pictipes</i>	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi BUG5305</i>	1083	<i>R. pictipes</i>	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi BUG5311</i>	1084	<i>R. pictipes</i>	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi BUG5300</i>	1085	<i>R. pictipes</i>	Santana (AP)	TC I
<i>T. cruzi B:5975</i>	1075	<i>P. opossum</i>	Santana (AP)	TC I
IGF 01	1637	<i>O. bicolor</i>	Santana (AP)	TC I
IOF 02	1632	<i>M. cinerea</i>	Santana (AP)	TC I
SI MA 03	1620	<i>O. macconnelli</i>	Santana (AP)	TC I
5514	1577	Homem	Barcarena (PA)	TC I
5779 XE: 7511	1582	Homem	Barcarena (PA)	TC I
5106	1583	Homem	Barcarena (PA)	TC I
5649	1589	Homem	Barcarena (PA)	TC I
14844	1591	Homem	Barcarena (PA)	TC I
BARC1	1564	<i>R. pictipes</i>	Barcarena (PA)	TC I
BARC2	1565	<i>R. pictipes</i>	Barcarena (PA)	TC I
BARC3	1566	<i>R. pictipes</i>	Barcarena (PA)	TC I
BARC4	1567	<i>R. pictipes</i>	Barcarena (PA)	TC I
BARC8	1569	<i>R. pictipes</i>	Barcarena (PA)	TC I
BARC9	1570	<i>R. robustus</i>	Barcarena (PA)	TC I
BARC5	1568	<i>R. robustus</i>	Barcarena (PA)	TC I

BAR1	1571	<i>D. marsupialis</i>	Barcarena (PA)	TC I
BAR6	1573	<i>D. marsupialis</i>	Barcarena (PA)	TC I
BAR4	1578	<i>D. marsupialis</i>	Barcarena (PA)	TC I
BAR3	1579	<i>D. marsupialis</i>	Barcarena (PA)	TC I
ARA1	1592	<i>D. marsupialis</i>	Barcarena (PA)	TC I
BAR2	1572	<i>M. nudicaudatus</i>	Barcarena (PA)	TC I
B 5302 CRIO 2701	1423	<i>M. nudicaudatus</i>	Barcarena (PA)	TC I
ISD 147333	1390	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
IMD 14728	1391	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
XE: 7389 14723	1396	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
XE: 7402 14780	1397	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
ISD 14732	1398	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
XE: 7390 PARDC 14727	1408	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
RMA 5620 14730	1409	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
MGSD 5617 14729	1410	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
MDT 5623 14782	1411	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
MDT PARDC 14783	1436	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
XE 7392 PARDC 14729	1454	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
XE 7391 5650	1507	Homem	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
MF9	1358	<i>R. picitpes</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5833	1363	<i>R. picitpes</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5872	1364	<i>R. picitpes</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
<i>Bug 5873/3</i>	<i>1360</i>	<i>R. picitpes</i>	<i>Cachoeira do Arari (PA)</i>	<i>TC I</i>
Bug 5810/3	1366	<i>R. picitpes</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5904/3	1368	<i>R. picitpes</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5909	1370	<i>R. picitpes</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5910/3	1371	<i>R. picitpes</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5906/3	1379	<i>R. picitpes</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5814/15/3	1383	<i>R. picitpes</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5905/3	1378	<i>R. picitpes</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
MF6	1359	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5844/3	1361	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5917/18/19/3	1362	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5902/3	1365	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5878/3	1367	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5916/3	1369	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5912/3	1372	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5837/3	1373	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5908/3	1374	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5915/3	1375	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5855/3	1376	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5850/3	1377	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5907/3	1380	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5834/35/3	1381	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5859/60/3	1382	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5781/82/3	1384	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5826/27/3	1388	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5914/4	1393	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5838/3	1394	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
MF6	1395	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
Bug 5877/3	1399	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I

PA 528	1403	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
PA 519	1404	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
MF7	1357	<i>R. robustus</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
AR2	1574	<i>D. marsupialis</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
AR3	1575	<i>D. marsupialis</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
AR5	1576	<i>D. marsupialis</i>	Cachoeira do Arari (PA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 829	829	<i>R. rattus</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 904	904	<i>R. rattus</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 848	848	<i>R. rattus</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 849	849	<i>R. rattus</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 850	850	<i>R. rattus</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 914	914	<i>R. rattus</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> B 5024	958	<i>R. rattus</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> B 5108	963	<i>R. rattus</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> B 5109	964	<i>R. rattus</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 830	830	<i>D. marsupialis</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 831	831	<i>D. marsupialis</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 832	832	<i>D. marsupialis</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 903	903	<i>D. marsupialis</i>	São Luiz (MA)	TC I
SL, MA2	1604	<i>D. marsupialis</i>	São Luiz (MA)	TC I
AR6	1605	<i>D. marsupialis</i>	São Luiz (MA)	TC I
B6872	1606	<i>D. marsupialis</i>	São Luiz (MA)	TC I
ARA 5	1622	<i>D. marsupialis</i>	São Luiz (MA)	TC I
SL-MA1	1627	<i>D. marsupialis</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 846	846	<i>R. neglectus</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 847	847	<i>R. neglectus</i>	São Luiz (MA)	TC I
Bug SL04	1625	<i>R. robustus</i>	São Luiz (MA)	TC I
Bug SL05	1628	<i>R. robustus</i>	São Luiz (MA)	TC I
Bug SL 01	1666	<i>R. robustus</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 905	905	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 906	906	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 907	907	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 908	908	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 912	912	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 913	913	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 915	915	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 916	916	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 917	917	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 918	918	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 919	919	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 927	927	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi bug</i> 7645	951	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi bug</i> 8314	952	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi bug</i> 8316	953	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi bug</i> 8375	954	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi bug</i> 8431	955	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi</i> 9241	957	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi bug</i> 7493	960	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi bug</i> 10258	961	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I
<i>T. cruzi bug</i> 8412	962	<i>T. rubrofasciata</i>	São Luiz (MA)	TC I

6. DISCUSSÃO

A doença de Chagas já é considerada endêmica e emergente na Amazônia devido ao grande número de casos autóctones descritos nos últimos 10 anos (Coura, 1990; Coura *et al.*, 2007). Na dinâmica de transmissão da enfermidade na Região participam apenas reservatórios e vetores silvestres, além de precárias práticas de preparação de polpa de frutas frescas, majoritariamente açaí, sendo a via oral a principal fonte de transmissão (Valente S *et al.*, 2009, Miles *et al.*, 2009, Miles, 2010).

Segundo informações do Instituto Evandro Chagas, (2011 – dados não publicados), já foram registrados 1125 casos agudos na Região e a ocorrência coletiva através de surtos de DCA associadas à transmissão pela via oral, estaria associada a 75% dos casos agudos. Estes casos vêm ocorrendo regularmente, sobretudo em regiões urbanas e rurais de municípios do nordeste do Estado do Pará e nos municípios de Santana e Macapá, sudeste do Estado do Amapá.

Desde que foram descritos os primeiros casos de DCA pela via oral na Amazônia (Shaw *et al.* 1969) o número de casos registrados da doença cresceu muito (Pinto A *et al.* 2008, 2009) e esta via tem se tornado nos últimos cinco anos o principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas no Brasil, notadamente na Região Norte (Aguillar *et al.*, 2007; Coura *et al.*, 2007).

A ocorrência de surtos de DCA fora da Amazônia Brasileira foi esporadicamente registrada em dois surtos: no sul do Brasil, um em Teutônia (RS) Coura (1966); Silva N (1968) sem definição do alimento envolvido na transmissão, e em 2005 em Navegantes (SC) incriminando o caldo de cana contaminado com triatomíneos triturados como fonte de parasitos (Brasil, 2005, Steindel *et al.*, 2008). Mais tarde, ocorreram surtos na Região Nordeste, nos estados da Paraíba, associado novamente a ingestão de caldo de cana contaminado com fezes de triatomíneos (Shykanay-Yasuda *et al.* 1991), na Bahia e no Ceará (dados não publicados) e no Tocantins (Oliveira *et al.* 2011). Nestes surtos não foram evidenciados os alimentos envolvidos na transmissão. Por outro lado, os surtos de DCA vêm ocorrendo regularmente na Amazônia Brasileira há mais de 10 anos entre os meses de agosto e novembro em regiões bem definida, e quase sempre associada ao açaí, alimento largamente consumido fresco na Região (Valente S 2008; Valente S *et al.*, 2009, Nóbrega *et al.*, 2009).

Apesar de frequentes, os surtos de DCA na Amazônia apresentam estudos escassos e fragmentados sobre os reais mecanismos de transmissão, o papel dos reservatórios e vetores envolvidos, as linhagens e genótipos de *T. cruzi* predominantes e o perfil clínico, parasitológico e imunológico dos pacientes (Beltrão, *et al.*, 2009; Miles, *et al.*, 2009; Valente S *et al.*, 2009).

No primeiro surto da Amazônia, ocorrido em Belém, Shaw *et al.* (1969), todos os pacientes exibiram exames parasitológicos e sorológicos positivos e sintomas gerais como febre, cefaleia, mialgia e artralgia. Os investigadores não encontraram triatomíneos no domicílio dessas pessoas, nem outra

provável fonte de infecção, e especularam sobre uma sopa que teria sido servida e ali poderia ser a fonte comum de infecção. Posteriormente, nos surtos e casos que se sucederam nas décadas seguintes, os pacientes apresentavam um perfil clínico e laboratorial muito semelhante (Valente S *et al.*, 2003; 2004; 2006; 2009; Pinto A *et al.*, 2004; 2008; 2009). Porém, as investigações epidemiológicas desses casos e surtos permaneciam sempre pontuais e na maioria das vezes inconclusivas.

O trabalho desenvolvido durante essa tese estudou as populações humanas, os reservatórios, os vetores silvestres e o perfil genotípico de isolados de *T. cruzi* em três surtos ocorridos no Estado do Pará e um no Estado do Amapá. No Estado do Maranhão, que não apresentou casos humanos, foi detectada a presença de triatomíneos e mamíferos infectados no domicílio humano. Os surtos do Pará ocorreram em municípios do nordeste do Pará e o do Amapá em Santana no sudeste do Estado. Todos estes municípios (do Pará e Amapá) estão inseridos no estuário da Bacia do Marajó, Região que também se caracteriza como a maior produtora de açaí da Amazônia e concentra grande parte da casuística de DCA na Região (Pinto A *et al.*, 2008, Valente S *et al.*, 2006; 2009).

6.1. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, SINTOMATOLOGIA E DADOS GERAIS DOS SURTOS ESTUDADOS

Atualmente o diagnóstico da DCA na Amazônia segue as propostas estabelecidas nos Consensos Brasileiros de Doença de Chagas (Brasil, 2005). No passado, dependiam da estrutura disponível nos Estados, dos recursos e tipos de estudos realizados, com isso gerando casuísticas e soroprevalências muito distintas. Quando realizaram estudos sorológicos na Região de Barcelos no Estado do Amazonas, Coura *et al.* (1997) apresentaram uma prevalência inicial de 13,2% de positividade para anticorpos anti-*T. cruzi* entre 886 amostras analisadas por IFI e ELISA. Mais tarde, submetendo estas mesmas amostras com marcadores mais específicos, o índice foi reduzido para 6,8% Coura *et al.*, (1999). A soroprevalência foi observada entre ribeirinhos que viviam da exploração da fibra da piaçava e constantemente eram atacados por triatomíneos (*Rhodnius brethesi*) que vivem nestas palmeiras Coura *et al.*, (1994; 1995; 2002a). E embora tenha sido detectada a infecção chagásica em alguns pacientes, a presença de casos e/ou surtos de doença de Chagas aguda nesses estudos nunca foi registrada.

Os surtos estudados nos municípios do Estado do Pará (Barcarena, Belém e Cachoeira de Arari) foram muito semelhantes entre si, mas com diferenças daquele registrado em pacientes de Santana no Estado do Amapá, sobretudo no que tange ao número de pacientes acometidos, só em Santana foram 27 pacientes. No que se refere à ocorrência entre sexos, os homens foram os mais acometidos nos surtos de Belém, Cachoeira do Arari (58% cada) e Santana (54%), e as mulheres no

surto de Barcarena 75% (9/12). A faixa etária dos pacientes não foi concordante entre os quatro surtos, mas o surto de Santana acometeu principalmente crianças e jovens entre 6 e 18 anos 55,55% (15/27).

A distribuição temporal dos casos de DCA apontou que estes aconteceram entre os meses de julho a dezembro, e, em concordância com os achados de Pinto *et al.* (2008) e Valente S (2008) que estudando ampla casuística nos Estados do Pará e Amapá observaram que a maioria dos casos agudos na Região coincidem com o período do verão amazônico (junho a novembro), caindo substancialmente no período chuvoso (Janeiro a maio). Mesmo nas áreas endêmicas, historicamente, a maioria dos casos de DCA foi observada na estação seca, quando os triatomíneos teriam uma atividade vetorial mais intensa (Laranja *et al.*, 1956, Dias 1982). Em nossa Região, a elevada umidade e intenso período de chuvas no inverno amazônico dificulta a dispersão do vôo dos insetos. Esta dispersão, no entanto é facilitada no verão quando a umidade é mais baixa, e estimulada pelas queimadas para estabelecimento de roças e exploração de madeira. Provavelmente, estes fatores afugentam as fontes alimentares dos triatomíneos de seus ecótopos e os triatomíneos adultos voam em busca de alimento e invadem casas atraídos pela luz, como comprovaram os estudos de Naiff *et al.* (1998) e Castro *et al.* (2010) realizados em Manaus e por Abad-Franch *et al.* (2007; 2009) no Equador.

Estudos sobre a fase aguda da doença de Chagas não são freqüentes, mesmo nas áreas endêmicas. Añez *et al.* (1999) trabalhando em regiões endêmicas da Venezuela analisaram 59 casos agudos com pacientes exibindo febre, mialgia, cefaleia, tosse e sintomas gerais. Um total de 13,55% dos pacientes exibiu algum tipo de sintomatologia cardíaca, os casos assintomáticos foram 9 (15,25%), mas todos com sorologia positiva. Quando foram aplicados os testes parasitológicos, esses pacientes revelaram positividade para xenodiagnóstico (61%), hemocultura (53%) e gota espessa (34%).

Nesse trabalho, foram examinadas 151 pessoas de quatro surtos em municípios do Pará e Amapá, foram identificados 63 pacientes parasitologicamente positivos para *T. cruzi* e nenhum deles exibiram sinais de porta de entrada (sinais de picada e edemas do parasito). Os principais sintomas apresentados pelos pacientes foram: febre 100% (63/63); mialgia 76,19% (48/63); cefaleia 74,60% (47/63); palidez 60,31% (38/63); dor abdominal 47,61% (30/63); dispnéia 46,03% (29/63); edema de membros 34,92% (22/62); artralgia e edema de face 33,33% (21/63). No surto de Santana (AP), 17 pacientes apresentavam síndrome cardíaca, a queixa inicial com cardite, derrame pericárdico, e aumento da área cardíaca (dados não apresentados nesta tese).

Em trabalhos apresentados com Pinto *et al.* (2008), examinamos 233 pacientes em fase aguda na Amazônia Brasileira (Pará, Amapá e Maranhão) e observamos que o mais frequente encontro ecocardiográfico foi o derrame pericárdico. Miles *et al.*, (2009) especulam que o derrame pericárdio pode explicar a cardiomiopatia associada à baixa parasitemia periférica e ser um aspecto até então

negligenciados da patogênese da doença de Chagas. Esta premissa de baixa parasitemia periférica, entretanto, não corresponde aos dados de parasitemia que obtivemos nesta tese.

A sintomatologia observada nesta casuística e reportada por Pinto *et al.* (2008) e os exames parasitológicos e sorológicos observados foram muito semelhantes com os estudos apresentados nesta tese. Foi observada concordância com os resultados obtidos por Añez *et al.* (1999) na Venezuela, porém, nossos resultados dos exames parasitológicos foram bem mais sensíveis. No nosso trabalho, a carga parasitária elevada pode ser um indicativo importante da exuberância dos sintomas exibidos pelos pacientes considerando que o xenodiagnóstico apresentou positividade de 79,36% (50/63); a hemocultura 61,90% (39/63); QBC 58,73% (37/63) e a gota espessa 41,26% (26/63).

Valente S (2008) analisou seis surtos no Pará em 97 pacientes com rica sintomatologia representada por febre, calafrio, adenopatia, cefaleia, eritema nodoso, mialgia, artralgia, eritema cutâneo e sintomas gerais. Um total de 95 pacientes (97,93%) apresentou exames sorológicos e parasitológicos positivos, novamente revelando a presença de elevada carga parasitária na circulação periférica facilitada, talvez, pela transmissão oral, quando os pacientes infectados nos surtos podem ingerir uma grande quantidade de tripanossomas. Em um estudo no Município de Mazagão, Estado do Amapá, realizado com Valente S *et al.* (2009), foi descrito um surto de 17 casos agudos com grande semelhança com os dados aqui expostos. O surto ocorreu em uma comunidade fechada e a população estudada nunca se ausentara do município; não foram encontrados triatomíneos colonizando os domicílios, mas capturamos consideráveis números desses insetos em palmeiras regionais muito próximas das casas dos ribeirinhos. Com estes dados foi possível estabelecer com evidências epidemiológicas bem claras o envolvimento de triatomíneos silvestres atraídos pela luz que, acidentalmente, caíam dentro de uma máquina de extração de polpa de açaí, sendo triturados juntos com esses frutos contaminados, assim, as pessoas que consumiram o suco.

Em recente estudo sobre um dos maiores surtos de DCA que se tem conhecimento ocorrido em Chacao, periferia de Caracas, Venezuela, De Noya *et al.* (2010) confirmaram a infecção em 103 dos 1.000 indivíduos expostos. Dos infectados, 75% eram sintomáticos, 20,3% necessitaram de internação hospitalar, 59% apresentaram alterações cardiológicas, uma criança morreu, e a parasitemia (gota espessa e exame a fresco) foi detectada em 44. Estes são semelhantes com aqueles que obtivemos nos nossos achados parasitológicos em surtos nos estados do Pará e Amapá.

As características clínicas registradas em Chacao também assemelham-se com nossos estudos em ordem de importância com o registro de febre, artralgia, edema de face, dor abdominal e dispnéia. Em Chacao, por se tratar de uma população de escolares, a taxa de infecção foi maior entre crianças mais novas, ao contrário de nossos achados, que ocorreram principalmente em adultos.

Estudos em Chacao concluíram ter sido um único surto, que teria ocorrido pela ingestão de suco de goiaba, que acometeu essa população urbana, resultando em uma emergência de saúde pública sem precedentes. O pronto diagnóstico e tratamento evitou uma maior letalidade no surto.

6.2. ESTUDOS SOROLÓGICOS REALIZADOS

Na pesquisa sorológica realizada nas comunidades associadas aos surtos aqui estudados, em uma amostragem de 2648 pessoas nas quais aplicamos o teste de triagem HAI se detectou 3,05% (81/2648) de indivíduos reagentes. Quando os testes de IFI (padrão ouro) para pesquisa de IgG anti-*T. cruzi* foram utilizados nestas amostras, o número de reagentes caiu para 2,49% (66/2648). De 2,37% (63/2648) de positivos para anticorpos IgM anti-*T. cruzi* todos os testes sorológicos dos pacientes apresentaram resultados positivos, alguns sem uma correspondência parasitológica imediata, sobretudo naqueles de Santana que foram diagnosticados muito tardiamente e os picos parasitêmicos foram perdidos. No entanto, os testes sorológicos se revelaram eficientes marcadores e os resultados são corroborados com os achados que realizamos com Pinto *et al.* (2008) entre pacientes de fase aguda no Pará e Amapá que apresentaram títulos positivos para IgM 86,7% (202/233) e IgG e 94,8% (221/233), com diluições de soro entre 1/40 a 1/1280.

Nesta tese, seguiu-se a metodologia proposta por Gutierrez *et al.*, (2004), e considerando as limitações de especificidade da HAI, devido à elevada sensibilidade, esse método foi muito útil para a triagem de pacientes. Por outro lado, a IFI para anticorpos IgG e IgM (Frank *et al.*, 2003; Umezawa *et al.*, 2004), apesar de ser uma técnica de maior dificuldade operacional, é considerada o padrão ouro e serviu plenamente para confirmação do diagnóstico dos pacientes da Amazônia.

Os testes sorológicos aplicados nas comunidades em São Luís foram todos negativos, apesar do ciclo domiciliar do *T. cruzi* estar presente, circulando entre ratos e *T. rubrofasciata*. Este fato corrobora a grande preferência que o vetor envolvido, *T. rubrofasciata* têm pelo sangue de *R. rattus* Braga *et al.*, (1999).

Nosso grupo, estabelecido desde 1992, estruturou uma base sólida para o diagnóstico, tratamento e seguimento de pacientes com doença de Chagas aguda. Nossa casuística já reúne um contingente de pelo menos 800 pacientes atendidos. Algumas questões sobre a futura evolução desses pacientes merecem as seguintes reflexões: Qual o verdadeiro prognóstico dos quase 800 casos agudos tratados? Qual o real tamanho do universo de infectados que não foram diagnosticados e podem ser doentes crônicos? Os tratados foram realmente curados? Evoluirão para fase crônica? Quais manifestações poderão apresentar?

Questões que talvez este grupo não tenha ainda tido a oportunidade de responder completamente. Estamos criando bases para que junto com outros grupos venha a perseguir e, quem sabe, responder nos próximos anos. Um aspecto importante da doença de Chagas na Amazônia é a possibilidade da doença fora da atual área de maior ocorrência, no nordeste do Pará, em regiões onde o acesso às pessoas é muito difícil e o acompanhamento se tornaria inviável.

A emergência de numerosos casos agudos e algumas dificuldades que podem ser encontradas para o diagnóstico da DCA na Amazônia Brasileira preconiza utilizar testes rápidos e mais eficientes, alguns já em avaliação (Sabino *et al.*, 2010). Além disso, há a necessidade de ferramentas que possam identificar pacientes curados logo após o tratamento específico e, ainda mais difícil, estabelecer um marcador de prognóstico para os casos tratados. Esforços para a padronização de testes e a melhoria da sensibilidade e especificidade dos antígenos para detecção de anticorpos para *T. cruzi* tem sido empregado por vários centros de diagnóstico (Gomes *et al.*, 2009). Os testes sob avaliação incluem um ensaio de PCR com resultados promissores utilizado como teste confirmatório na fase aguda e crônica da doença (Ramirez *et al.* 2009), e foi motivo de um encontro recente visando estabelecer um protocolo comum para aplicação do teste (Schijman *et al.*, 2011).

6.3. ESTUDOS DE RESERVATÓRIOS

Todas as ordens de mamíferos (Arthiodactyla, Carnívora, Chiroptera Didelphiamorphia, Primata, Rodentia e Xenarthra), com exceção dos marinhos, são reservatórios do *T. cruzi*, e compõe um mosaico de interações no ciclo silvestre, do qual faz parte ecótopos terrestres (buracos no chão e em pedras) e arbóreos (buracos em árvores, bromélias e copas de palmeiras) em florestas primárias, secundárias e de capoeiras, regiões andinas e charcos, serrados, caatingas, campos abertos naturais e abertos pelo homem, florestas tropicais da Amazônia e Mata Atlântica da América do Sul, e florestas da América Central e do Norte (Coura *et al.*, 2002b; Miles *et al.*, 2003; Yeo *et al.*, 2005).

Como enzootia o ciclo de *T. cruzi* é conhecido desde o trabalho pioneiro de Carlos Chagas, (1924 a,b) realizado no Estado do Pará, quando encontrou tripanossomas no sangue de macacos *Chrysothrix sciureus*. Deane L *et al.* (1961b; 1964a,b; 1967), trabalhando no Pará e Amapá, detectaram diferentes taxas de infecção por *T. cruzi* para tripanossomatídeos em roedores, morcegos e marsupiais. Um importante marco nos estudos com animais silvestres foi estabelecido por Miles *et al.* (1976), quando foi apresentado um inovador meio de seguimento de mamíferos até seus ninhos, assim identificando os ecótopos de várias espécies de mamíferos associadas ao ciclo de transmissão do *T. cruzi*. Esta metodologia aplicada em diferentes regiões do Brasil permitiu esclarecer também a associação dos mamíferos com triatomíneos silvestres (Miles *et al.*, 1981a,b; Póvoa *et al.*, 1984).

Apesar da presença predominante do *T. cruzi* no ciclo silvestre na Amazônia estudado em vários momentos, Miles *et al.* (1978; 1981a; 1986; 2003), Valente S *et al.* (1999b), Coura *et al.* (2002a), DIAS *et al.* (2002a), achados de mamíferos domésticos como o porco na Região do Marajó, e animais sinantrópicos como os marsupiais infectados, Valente V *et al.* (1998), Luitgards-Moura *et al.* (2005) permitem vislumbrar a aproximação do *T. cruzi* do domicílio do homem.

Não se conhece precisamente como se dá a participação dos mamíferos silvestres na transmissão da doença de Chagas. Sabe-se que na natureza, mamíferos e triatomíneos dividem o mesmo ecótopo e o ciclo do *T. cruzi* entre eles se dá pelo fato dos mamíferos também serem insetívoros e assim comerem os triatomíneos infectados com *T. cruzi* (Coura, 1997). Os didelfídeos podem também transmitir acidentalmente formas tripomastigotas infectantes para o homem eliminadas nas secreções anais (Deane *et al.*, 1984; Lenzi 1984; Naiff *et al.*, 1987; Jansen *et al.*, 1999). Outra forma seria a ingestão de carne destes mamíferos sem o devido cozimento, fato observado entre tribo de índios do Equador (Amúnarriz *et al.*, 1991). Rotas pouco esclarecidas de contaminação pelo *T. cruzi* seriam as responsáveis em manter os ciclos de transmissão dos surtos de doença de Chagas que vêm ocorrendo no Brasil, principalmente na Região Norte e associados ao consumo de alimentos contaminados com formas viáveis de *T. cruzi* (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991; Miles *et al.*, 2003; Valente S *et al.*, 1999a; 2006; 2009, Steindel *et al.*, 2008; Bastos *et al.*, 2010; Monteiro W *et al.*, 2010).

Neste trabalho, a captura de animais silvestres durante os estudos dos surtos de DCA somou 24 mamíferos silvestres (treze exemplares de *D. marsupialis*, 1 *M. cinerea*, 5 *Philander opossum*, 3 *Metachirus nudicaudatus*, 1 *Oryzomys macconnelli* e 1 *Oecomys bicolor*). Esse pequeno número de animais capturados e a maioria de *D. marsupialis* se deveu pelo fato das coletas se concentrarem em locais muito próximos de comunidades populosas e com áreas de matas reduzidas. A taxa geral de infecção dos animais coletados neste trabalho foi de 7,14% (29 positivos entre 406 examinados) e foi semelhante com os resultados obtidos por Lainson *et al.* (1979), Miles *et al.* (1981a,b) e Valente S (2008) examinando animais coletados durante estudos na Região quando obtiveram taxa de infecção entre 8,3 % e 12%, sendo que estes autores trabalharam em área mais preservada e nós enfrentamos ainda o efeito das marés em área de várzea.

Em São Luís, Maranhão, onde não ocorreram casos de doença de Chagas, foram coletados no ambiente doméstico 433 espécimes de *R. rattus* muito numerosos nos locais por conta das condições das habitações e do sistema de coleta de lixo, ambos precários. Também se coletou 9 exemplares de *D. marsupialis* em uma área de preservação ambiental a 2 km dos domicílios.

D. marsupialis e *R. rattus* são considerados animais sinantrópicos carreando infecção por *T. cruzi* entre a mata e o domicílio humano Miles *et al.* (2003); Yeo *et al.* (2005); Pinto C *et al.* 2006), possibilitando a contaminação de alimentos e a ocorrência de casos e/ou surtos de doença de Chagas.

Hábitos culturais, e até mesmo necessidade de alimentação, levam populações ribeirinhas a consumirem muitos desses animais criando, assim, novas opções de transmissão do *T. cruzi* e do surgimento de casos agudos de DC na Região, independente da colonização de triatomíneos no domicílio humano (Valente S *et al.*, 2006).

Os achados de São Luís oferecem um contraponto interessante. O mamífero doméstico e peridoméstico *R. rattus*, coletados nos quintais e dentro dos domicílios, apresentou 2,9% (11/373) de infecção. Esse animal mantém com o *T. rubrofasciata* um ciclo doméstico de *T. cruzi*, sem casos de infecção humana. Próximos das áreas de captura dos ratos foram coletados *D. marsupialis* também infectados com *T. cruzi*. Achados semelhantes foram observados por Herrera *et al* (1997) quando examinou roedores nas localidades de Colinas de Bello Monte, no Vale de Caracas na Venezuela. Nesse local, *R. rattus* apresentou infecção para 16,66% dos animais examinados. Na localidade de Lojas da Província de Guayas, no sudeste do Equador, Pinto C *et al.* (2006) trabalhando em habitações rurais e urbanas encontrou várias espécies de marsupiais e roedores, entre as quais *R. rattus* com 18,3% de infecção para *T. cruzi*, demonstrando que esse animal é um hospedeiro importante para manter o ciclo doméstico em algumas localidades do Equador. Os trabalhos na Venezuela e Equador não associaram os mamíferos com triatomíneos, mas em ambos os países a presença do *R. prolixus* é significativa, sendo esse o vetor mais importante, capaz de transmitir *T. cruzi* entre o homem e animais de diferentes espécies (Galvão *et al.*, 2003).

Em analogia com os nossos resultados em São Luís, provavelmente os didelfídeos sinantrópicos vindo infectados das matas trouxeram o *T. cruzi* para o ambiente doméstico e o ciclo se mantém agora com ratos e *T. rubrofasciata* infectados. Mais recentemente, em trabalho realizado na Província de Loja, Equador, por Ocaña-Mayorga *et al.* (2010) caracterizou genótipos de *T. cruzi* utilizando marcadores de microsátélites, responsabilizando mamíferos sinantrópicos como *D. marsupialis* e *R. rattus* infectados como pontes entre os ciclos de transmissão silvestre e doméstico. Esses animais mantinham estreitas relações, e até permutas de nichos, com espécies de triatomíneos locais nos distintos ciclos. Estas mudanças de atores (triatomíneos e mamíferos) entre os ciclos são reflexos diretos de mudanças ambientais provocados pela atividade humana.

Estudos mais atualizados e globalizados sobre a participação de tripanossomatídeos em mamíferos na Região são escassos. Os ciclos de transmissão, os hábitos e habitats e a diversidade genética dos isolados tem sido estudados de maneira pontual por Miles *et al.* (1986); Coura (2007); Marcili *et al.* (2009a,b); Fernandes *et al.* (2001); Maia da Silva *et al.* (2008) e precisam avançar sobre novas fronteiras da Amazônia.

6.4. ESTUDOS DE TRIATOMÍNEOS

Triatomíneos silvestres são distribuídos em toda a Amazônia e segundo Galvão *et al.* (2003) foram contabilizados até o momento 21 espécies. Entretanto, estudos mais recentes indicam que o número de espécies pode chegar a 27, se forem consideradas algumas subespécies renomeadas e distribuídas na Região Abad-Franch & Monteiro (2007); Aguilar *et al.*, (2007). Estas espécies habitam variados ecótopos como buracos no chão (*P. geniculatus*), buracos em árvores (*P. lignarius* e *E. mucronatus*), bromélias (algumas espécies de *Rhodnius*), tocas de animais (espécies dos gêneros *Panstrongylus* e *Rhodnius*) e principalmente em dezenas de espécies de palmeiras (espécies do gênero *Rhodnius* e algumas do gênero *Panstrongylus*) que se distribuem por toda a Região.

Algumas destas espécies têm hábitos muito diversificados assim, populações de *P. geniculatus* têm comportamento recluso vivendo em buracos no chão com tatus Miles *et al.* (1981a), enquanto outras populações da mesma espécie são extremamente versáteis habitando palmeiras, invadem o domicílio Naiff *et al.* (1998) e já foram encontrados até co-habitando com porco doméstico na Região do Marajó, estado do Pará VALENTE V *et al.*, (1998). Outra espécie muito eclética é o *R. pictipes* que na Amazônia, mesmo habitando palmeiras de grande importância regional como de urucuri, inajá, dendê, bacaba e babaçus, os adultos voam, eventualmente, para dentro dos domicílios atraídos pela luz e, assim, têm sido associados com casos de doença de Chagas Lainson *et al.*, (1979); Valente S *et al.*, (2006); Miles *et al.* 2009). Há ainda que se registrar a presença do *R. prolixus* que habita tanto palmeiras de diversas espécies, como o domicílio humano na Venezuela, Colômbia e países da América Central Gaunt & Miles (2000); Abad-Franch *et al.*, (2005).

Enquanto isso, espécies altamente seletivas como o *R. brethesi*, encontrada exclusivamente na palmeira *Leopoldinia piassaba*, da qual se extrai a fibra de piaçava para fabricação de vassouras, é uma espécie agressiva e foi relatada atacando o homem no município de Barcelos, Estado do Amazonas Coura *et al.*, (1994; 1995; 2002a); Mascarenhas *et al.*, (1991). Outras espécies reclusas pertencem ao gênero *Cavernicola*, cujas espécies habitam cavernas e são associadas com morcegos, sem relatos de importância na transmissão da DC Lent & Wigodzinsky, (1979).

Neste trabalho, durante o estudo com triatomíneos no entorno das localidades onde ocorreram os surtos de doença de Chagas foram capturados as seguintes espécies: *R. robustus* (n=137), *R. pictipes* (n=94), *E. mucronatus* (n=6), *R. neglectus* (n=5) *P. geniculatus* (n=12) e *P. lignarius* (n=6). Em São Luís (MA), no ambiente doméstico sem casos de doença de Chagas, a única espécie capturada foi *T. rubrofasciata* (n=3008), sendo que somente 128 exemplares puderam ser examinados e foi observada taxa de infecção de 30.46% (39/128).

As palmeiras foram os principais ecótopos das seis espécies de triatomíneos silvestres capturadas. O urucurizeiro (*S. martiana*) apresentava infestação de 47,41% (101/213); o inajazeiro (*M. regia*) 35,21% (75/213); o babaçueiro (*O. speciosa*) 5,16% (11/213); o dendezeiro (*E. melanococca*) 1,87% (4/213) e a bacabeira (*O. bacaba*) 10,32% (22/213). A importância econômica dessas palmeiras para as comunidades ribeirinhas é inquestionável: as palmas são utilizadas para cobertura de casas, as fibras servem para confecção de utensílios domésticos e os frutos consumidos como sucos, mingaus e geléias, além de utilizados como ração para animais como porcos domésticos. Assim, para evitar a derrubada destas árvores, adotamos a captura utilizando armadilhas de fita adesiva preconizada por Noireau *et al.* (1999) e dissecamos um número bem reduzido de palmeiras.

A presença de muitas palmeiras no peridomicílio com índices altos de infestação triatomínica pode atuar como uma importante fonte de dispersão das espécies de *Rhodnius* na América Latina e até na Amazônia Romanaña *et al.*, (1999); Fitzpatrick, *et al.*, (2008); Gurgel-Gonçalves *et al.*, (2008); Abad-Franch *et al.*, (2010); Calzada *et al.*, (2010). A construção de casas muito próximas das matas, em contato direto com estes ecótopos de triatomíneos, implica em visitas constantes destes insetos infectados aos moradores que são picados e, eventualmente, contraem a doença de Chagas, Coura *et al.*, 2002a; Miles *et al.*, (2003); Valente V *et al.*, (2009); Marcili *et al.*, (2009a).

Além de coletas em palmeiras, foram também capturados 42 exemplares de triatomíneos em armadilhas luminosas instaladas próximas das casas dos pacientes: *Rhodnius pictipes* 23,80% (10/42), 21,42% (9/42), *E. mucronatus* 14,28% (6/42) e *P. lignarius* com 11,90% (5/42). Os resultados apontam para um importante indicador entomológico, que deve ser considerado e intensivamente investigado, para que se faça um diagnóstico preciso das possíveis espécies de triatomíneos envolvidas na transmissão esporádica e nos surtos de doença de Chagas.

Sobre a utilização de armadilhas luminosas para coleta de triatomíneos, Castro *et al.* (2010) trabalhando em matas na periferia de Manaus, Estado do Amazonas, fizeram capturas durante um ano e obtiveram resultados bem semelhantes aos nossos quando coletaram 75 exemplares de 10 espécies, sendo que as mais prevalentes foram: *P. geniculatus* (38), *E. mucronatus* (17), *P. lignarius* (9) e *R. robustus* (5). Segundo aqueles autores, o período de maior captura, que concordou com os nossos achados de triatomíneos e ocorrência de casos de DCA, também se concentrou na estação seca do verão amazônico entre os meses de junho e novembro, com o maior pico em outubro que é classicamente o mês de maior casuística da DCA nos estados do Pará e Amapá como já descrevemos anteriormente (Pinto A *et al.*, (2008), Valente S *et al.*, 2008, 2009).

O tropismo dos triatomíneos pela luz elevaria as chances de contaminação acidental e aumento dos casos de DCA na Amazônia, fato que já vem sendo observado Coura *et al.*, 2002a; Miles *et al.*, 2003; e pelos trabalhos que realizamos com Valente S *et al.*, (2009). Diversos estudos já

realizados tanto no campo, Noireau & Dujardin (2001); Zeledón, *et al.* (2001); Carbajal de la Fuente *et al.* (2007), quanto em experimentos laboratoriais, Minoli & Lazzari (2006), tem indicado que os triatomíneos apresentam mecanismos de dispersão e atração tais como correntes de ar favoráveis, atração pela luz; emissão de gás carbônico, radiação e odores humanos. Todos esses fatores desempenham importante papel na invasão de domicílio por triatomíneos silvestres adultos, Minoli & Lazzari (2006). Por conseguinte, a prevenção eficaz da doença de Chagas na Amazônia exige grande vigilância entomológica e a integração das práticas atuais de vigilância epidemiológica.

6.5. ISOLAMENTO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

É extensa a variabilidade genotípica de isolados de *T. cruzi* e esta heterogeneidade se deve a uma diversificada composição de isolados procedentes dos ciclos silvestre e doméstico, dos quais participam triatomíneos e mamíferos de distintas espécies e o próprio homem. A apresentação de perfis distintos quando se utilizam diferentes metodologias na caracterização dos isolados de *T. cruzi* indica uma grande variabilidade das propriedades ecogeográficas, biopatológicas, imunológicas, bioquímicas, farmacológicas e de manifestações de formas clínicas Brener & Gazzinelli, (1997); Fernandes *et al.*, (1998); Marcili *et al.*, (2009a,b); Miles *et al.*, 2003; 2009; 2010).

Os primeiros marcadores bioquímicos para a caracterização de isolados de *T. cruzi* foram propostos por Miles *et al.* (1977; 1981a,b; 1986). Esses estudos estabeleceram três padrões isoenzimáticos de *T. cruzi* denominados de zimodemas (Z1, Z2 e Z3). Na ocasião em que estes padrões foram estabelecidos, Z1 e Z3 estavam associados somente ao ciclo silvestre, incluindo eventualmente o homem, e Z2 presente no ciclo doméstico relacionado à doença de Chagas aguda e crônica e manifestações crônicas cardíacas e digestivas.

Esta metodologia foi utilizada por diversos autores durante muitos anos. Steindel *et al.* (1995) analisando isolados de triatomíneos e animais silvestres observaram a predominância de Z1, além de perfis mistos de Z1+Z2, em ambiente de mata primária no Estado de Santa Catarina. Romanha & Brener, (1988) utilizaram esta metodologia em isolados humanos de *T. cruzi* em Minas Gerais, caracterizando como Z2 todos os isolados. Em Honduras, Acosta *et al.* (1991) diferenciaram *T. cruzi* de *T. rangeli* a partir da caracterização bioquímica de isoenzimas.

Mais tarde, uma metodologia mais simples e eficiente, baseada no gene de mini-exon e ribossômico foi utilizada para distinguir genotipicamente isolados de *T. cruzi*. Uma série de estudos realizados com essa metodologia, possibilitou ampliar os conhecimentos sobre a diversidade de linhagens de *T. cruzi*. Os trabalhos de Souto *et al.* (1996), Fernandes *et al.* (1998) e Zingales *et al.* (1998) confirmaram os achados isoenzimáticos. Considerando os biodemas, zimodemas e os

marcadores de mini-exon e ribossômico, a antiga denominação foi renomeada em uma reunião internacional de especialistas (Anônimo, 1999): Z1 passou a TC1, Z2 a TCII, enquanto que não houve mudança na denominação de Z3 devido a falta de dados. A linhagem Z3 Miles *et al.* (1977; 1978) não foi agrupada nas novas linhagens estabelecidas, mas foi, posteriormente, definida por marcadores do gene de mini-exon Fernandes *et al.* (1998) e subdividida em dois subgrupos, Z3A e Z3B, baseado em polimorfismo de ITSrDNA Santos *et al.*, (2002); Mendonça *et al.*, 2002).

Marcadores moleculares, como RAPD (Brisse *et al.*, 2000a,b), sequências do gene SSUrDNA (Brisse *et al.*, 2001) e análises de elevados locis enzimáticos (Breniere *et al.*, 2003) reuniram Z3 com TCII e revelaram extensa variabilidade da linhagem TCII, que foi reagrupada em 5 linhagens (TCIIa-e): TCIIb e TCIIe (sítio antroponótico do Argentina, Bolívia, Brasil e Chile); TCIIId (sítio antroponótico da Bolívia e Chile), TCIIa (sítios silvestres na Amazônia e TCIIc (ambiente silvestre da Amazônia, Nordeste do Brasil, Paraguai e Argentina) (Barrett *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1981a; Povia *et al.*, 1984; Gaunt & Miles, 2000; Yeo *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 1998a,b; Zingales *et al.*, 1999; Freitas *et al.*, 2006; Ceballos *et al.*, 2006; Cardinal *et al.*, 2008). As linhagens TCIIa seria o sub grupo Z3B e TCIIc corresponderia a Z3A, baseados em polimorfismo de ITSrDNA (Mendonça *et al.*, 2002). O agrupamento de isolados de *T. cruzi* nessas linhagens vem sendo confirmado a partir das análises de distintos genes nucleares e mitocondriais (Brisse *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2003; Westenberger *et al.*, 2005, 2006; Cariotipagem (Henriksson *et al.*, 2002; Pedroso *et al.*, 2003, 2007; Branche *et al.*, 2006), polimorfismo de loci de microssatélite (Machado e Ayala, 2001; Freitas *et al.*, 2006).

Uma recente mudança na denominação intra-específica de *T. cruzi* foi aprovada e formalmente recomendada por Zingales *et al.* (2009), sendo esta nomenclatura amplamente utilizada pela comunidade científica. Diante dos avanços nos marcadores moleculares para caracterização de isolados de *T. cruzi* procedentes de triatomíneos e mamíferos de distintas regiões geográficas, atualmente os isolados são agrupados em seis linhagens ou DTUs I-VI (*Discret Taxonomic Units*). DTU I correspondente à linhagem TcI, DTU II à linhagem TcIIb. As linhagens TcIIId e TcIIe que são híbridas correspondem as DTUs V e VI, respectivamente. As linhagens TcIIa e TcIIc foram reclassificadas como DTU IV e III, respectivamente.

O *T. cruzi* apresenta variados, complexos e desconhecidos ciclos de transmissão na Amazônia em que participam centenas de mamíferos, dezenas de triatomíneos silvestres e recentemente com maior presença, o homem. Estes hospedeiros estão infectados com linhagens distintas de *T. cruzi* em ciclos diferenciados conforme os nichos ecológicos e ecótopos. Apesar dos estudos já realizados na Região, hospedeiros silvestres e ciclos de transmissão destas linhagens não estão completamente esclarecidos Miles *et al.*, (1981a); Gaunt & Miles, (2000); Coura *et al.*, (2002a).

Este trabalho caracterizou pelo gene de mini-exon 151 isolados de *T. cruzi* (46 isolados do homem, 31 de outros mamíferos e 74 de triatomíneos) associados aos surtos. Todos esses isolados exibiram perfil da linhagem TcI, que é a linhagem amplamente predominante na Amazônia Brasileira.

A distribuição geográfica de TcI é ampla e alcança desde a América do Norte até o sul da América do sul, sendo a mais prevalente na Região Amazônica Miles *et al.*, (1981b), Valente S (2008); Valente S *et al.*, (2009). Inicialmente, quando ainda classificada como ZI e associada apenas ao ciclo silvestre, pensava-se que a infecção que esta linhagem apresentasse caráter benigno, raramente evoluindo para manifestações crônicas (digestiva e cardíaca). Na verdade, manifestações graves da doença por esta linhagem já havia sido proposta para casos de DCA em Goiânia e São Paulo quando roedores silvestres carregavam ambas as linhagens TcI e TcII, para dentro das casas (Luquetti *et al.* 1986). Nesta Região endêmica para DC, habitam espécies de triatomíneos domésticos e silvestres que re-invadem o domicílio mantendo ciclos ativos de transmissão da doença de Chagas Miles *et al.*, (1981b); Añez *et al.*, (2004); Samudio *et al.*, (2007); Fitzpatrick *et al.*, (2008).

Venezuela e países endêmicos do Noroeste da América do Sul e América Central, casos de DCA por TcI com cardiomiopatia têm sido associada com doença grave, incluindo meningoencefalite (Añez *et al.* 2004;. Burgos *et al.* 2008). Por outro lado, a concepção de que megaoesôfago e o megacólon são raros nessa Região, assim como na Amazônia Brasileira, ainda permanece (Sanchez-Guillen Mdel *et al.*, 2006). Somente estudos clínicos de seguimento, que ora realizamos no Pará e Amapá a médio e longo prazo, podem esclarecer estas dúvidas.

Estudos mostraram que TcIIc é uma linhagem que também pode ser encontrada na Amazônia Brasileira, reportada em várias espécies de mamíferos, especialmente espécies terrestres como tatu (*Dasypus novemcinctus*) e *Monodelphis* e, raramente em humanos e mamíferos peri-domésticos. Nessa Região, essa linhagem foi associada com *P. geniculatus* Miles *et al.*, (1981a); Póvoa *et al.*, (1984); Fernandes *et al.*, (2001); Coura *et al.*, (2002a). Não obstante, em outras regiões como o Nordeste do Brasil, e sul da América do Sul a linhagem TcIIc é comum em triatomíneos terrestres como *P. geniculatus*, *Triatoma infestans* e *Triatoma rubrovaria* Barrett *et al.*, (1980); Miles *et al.*, (1981a); Barnabé *et al.*, (2001); Yeo *et al.*, (2005); Cardinal *et al.*, (2008); Martins *et al.*, (2008).

A linhagem TcIIc (TcIII) ainda seja pouco conhecida no ciclo de transmissão doméstico, é uma linhagem que vem sendo bastante estudada. Isolados dessa linhagem são amplamente dispersos numa extensa área geográfica que vai do Norte da América do Sul a Argentina, com ciclos de transmissão preferencialmente relacionados com tatu da espécie *Dasypus novemcinctus* e, mais raramente, outros animais terrestres como o tatu *Euphractus sexcinctus*, *Monodelphis brevicaudata* e roedores terrestres (Yeo *et al.*, 2005; Marcili *et al.*, 2009b). As espécies de vetores triatomíneos implicados, não são bem conhecidas, mas são provavelmente triatomíneos terrestres como *P. megistus*

e *T. infestans*. As análises de sequências de ITS rDNA e de microssatélites revelou estrutura espacial da população de TcIII (Marcili *et al.*, 2009a,b; Llewellyn *et al.*, 2009b). No Brasil, os isolados de TcIII da Amazonia diferiam dos isolados dessa mesma linhagem do Nordeste/Sudeste e da Região Sul (Marcili *et al.*, 2009a). TcIII raramente causa doença de Chagas humana, mas tem sido frequentemente registrado em cães domésticos (Chapman *et al.*, 1984; Cardinal *et al.*, 2008; Marcili *et al.*, 2009b), contribuindo como um agente importante para a emergência da doença, facilitando transmissão entre os ciclos silvestre e doméstico.

O perfil genotípico dos isolados caracterizados neste trabalho concorda com os estudos de Valente S (2008) e com trabalhos que realizamos durante o desenvolvimento desta tese Valente S *et al.* (2009), Marcili *et al.*, (2009a,b), quanto à confirmação da prevalência da linhagem TcI de *T. cruzi* em isolados humanos, de mamíferos e triatomíneos silvestres na Amazônia. Entretanto, também encontramos alguns casos esporádicos de Z3, TcIIc e TcIIa que são as linhagens descritas até o momento na Região Amazônica Miles *et al.*, 1978; 1981a; Póvoa *et al.*, (1984).

Recentemente, um número maior de isolados foi genotipado e assim, Valente S (2008) estudando 97 isolados de seis surtos (sendo 48 de humanos) do Para é Amapá encontrou pela genotipagem pelo gene de mini-exon, TcI como linhagem predominante, porém quando examinadas por RAPD estes apresentaram intenso grau de polimorfismo. Quando nós caracterizamos pelo gene de mini-exon isolados de outro surto com 17 pessoas que adoeceram em Mazagão no Amapá em colaboração com Valente S *et al.* (2009), observamos que havia a predominância de genótipos de TcI, além de linhagem Z3 e amostras mistas de Z3+*T. rangeli* identificadas em humanos, mamíferos e triatomíneos silvestres, sugerindo talvez fontes distintas de infecção. Por outro lado, um surto estudado no Município de Coari, estado do Amazonas por Monteiro *et al.*, (2010) caracterizaram pelo gene de mini-exon 25 isolados humanos o sequenciamento revelou que todos os isolados apresentaram perfis da linhagem TCIII/Z3 de *T. cruzi* sugerindo uma única fonte de infecção. Nos dois surtos, entretanto, os autores garantem a origem silvestre das fontes de infecção. Infelizmente, em todos esses trabalho não foram utilizadas ferramentas capazes de identificar dentre os isolados Z3, aqueles pertencentes as linhagens TcIII ou TcIV, já que os métodos utilizados não discriminam essas linhagens.

Apesar dos surtos de DCA pela via oral ocorrerem na Amazônia Brasileira desde 1968, Shaw *et al.*, (1969) os estudos sobre o(s) mecanismo(s) de transmissão, alimento(s) reservatórios e vetores envolvidos são escassos. Os primeiros isolados humanos CANI-IV foram identificados por MLEE como Z3, somente dois isolados humanos (CAN III e JJ) foram confirmados como TCIIa (=DTU IV) usando distintos marcadores moleculares (Marcili *et al.*, 2009a; Miles *et al.*, 2009).

Marcili *et al.* (2009a,b) caracterizaram isolados do homem, de macacos e de triatomíneos do gênero *Rhodnius* como linhagens TcI e TcIIa (=DTUIV), estes genótipos participando de ciclos de

transmissão sobretudo, em ecótopos arbóreos, associados ou não à transmissão pela via oral na Amazônia Brasileira. Nesse estudo evidenciou-se que TcIV é uma linhagem homogênea e claramente separada das demais linhagens de *T. cruzi* quando analisadas por sequenciamento de genes ribossômico e de citocromo b. Essa linhagem foi reportada em macacos silvestres e triatomíneos da espécie *R. robustus* capturados em nossa áreas de estudo na Amazônia Brasileira.

Dos distintos ciclos de transmissão de *T. cruzi* participam diferentes linhagens e genótipos, em associações com diversos hospedeiros e vetores. Ainda assim, os reservatórios mamíferos naturais de TCIV, por exemplo, não são bem conhecidos na Amazônia Brasileira. Esta linhagem foi registrada em *Dasybus*, *Monodelphis* e *Panstrongylus* pela análise de zimodema Miles *et al.*, (1981a); Póvoa *et al.*, (1984); Gaunt & Miles (2000); Yeo *et al.*, (2005), e raras ocorrências em humanos, exceto as cepas CANI-IV, CAN III e JJ foram confirmados como TCIIa. Os vetores desta linhagem permanecem desconhecidos e o único relato está confinado ao nordeste do Estado do Amazonas é o *R. brethesi* Fernandes *et al.* (1998; 2001); Coura *et al.* (2002a); Mendonça *et al.* (2002); Pedroso *et al.* (2007), e talvez o *P. geniculatus* Miles *et al.* (1981a); Gaunt & Miles, (2000), triatomíneo de larga distribuição.

Os resultados de genotipagem de *T. cruzi* apresentados neste estudo confirmam unicamente a presença de TcI em isolados de pacientes dos surtos estudados em Barcarena, Belém e Cachoeira do Arari no Pará e Santana no Estado do Amapá, assim como nos mamíferos e triatomíneos silvestres a eles associados. Estes achados corroboram outros estudos regionais que descreveram TcI como a linhagem mais comum encontrada também em macacos silvestres *S. bicolor* em trabalhos descritos por Maia da Silva *et al.* (2008). Nesse trabalho, além de TcI, identificamos a linhagem TCIIa em 5 dos 21 isolados examinados de *Saguinus bicolor*. Esta linhagem até então não havia sido descrita em primatas silvestres no Brasil, não obstante a linhagem ter sido reportada em dois isolados de primatas silvestres da Bolívia e Venezuela (Westenberger *et al.*, 2006).

É importante o papel de mamíferos silvestres como macacos na epizootia do *T. cruzi*. Estudos realizados revelaram nestes animais infecção entre 10.3% a 46% por métodos parasitológicos ou sorologia respectivamente Ziccardi & Lourenço-de-Oliveira (1997); Lisboa *et al.*, (2006). Estes animais apresentam quadro de DCA, mas a doença neles é pouco estudada Miles *et al.*, (1979); Monteiro R *et al.*, (2010). Não se conhece o mecanismo de infecção destes animais, mas nos estudos que realizamos (Maia da Silva *et al.*, (2008), sugerimos que a via oral seja importante devido aos hábitos insetívoros dos macacos da Amazônia.

Em trabalhos anteriores (Marcili *et al.* 2009a,b) caracterizaram molecular e ecogeograficamente, mostrando que TcI e TCIIa participa do ciclo de *T. cruzi* entre primatas silvestres, sendo veiculados por *R. robustus* e *R. brethesi* na Amazônia brasileira.

Novos estudos sobre genótipos de *T. cruzi* em reservatórios silvestres e triatomíneos na Região devem ser encorajados e poderiam explicar melhor a distribuição de isolados de TCIIa e sua sobreposição entre variados ciclos compartilhando vetores e mamíferos em ecótopos diferentes. A plasticidade apresentada pelo *T. cruzi* em múltiplos ciclos de transmissão com hospedeiros e ecótopos variados contribui para a ocorrência de casos e surtos e são fatores decisivos para a emergência da doença de Chagas na Amazônia Brasileira.

Estudos baseados em polimorfismos dos genes SSU rRNA e citocromo b revelaram isolados de TCIIa e TcI em primatas e em casos humanos de DCA associados com infecção oral (Marcili *et al.*, 2009a,b), mostrando que isolados humanos são semelhantes áqueles de primatas silvestres e de triatomíneos do gênero *Rhodnius*, indicando vetores comuns para essas linhagens na Amazônia. Entretanto, resultados desta tese e dados de nosso grupo com 176 amostras de isolados de surtos ocorridos na Amazônia foram genotipados somente como TcI, o que demonstra claramente o predomínio desta linhagem na Região.

Embora os casos de DCA autóctones de nossos estudos tenha sido todos caracterizados como TcI, os pacientes dos quais foram obtidos apresentam manifestações clínicas variadas, intensas ou não, sendo os sintomas principais: febre, calafrios, cefaleia, palidez, mialgia, artralgia, eritema cutâneo, dispnéia e mio cardiopatia com aumento de área cardíaca, importante e intenso derrame pericárdico. História clínica semelhante foi referida em trabalhos realizados com Pinto *et al.*, (2009) quando acompanhamos 233 casos agudos nos Estados do Pará e Amapá.

Eventualmente, casos muito graves de rápida evolução para óbito têm sido descritos e, aparentemente, tem aumentado na Região, como mostrados em estudos realizados com Pinto *et al.*, (2004), além dos trabalhos de Xavier *et al.*, (2006); Aguilar *et al.*, 2007). Sintomatologia semelhante à da Amazônia, mas, sobretudo, com miocardite, também é referida em outros países como México, Panamá, Venezuela e Colômbia em que a linhagem TcI é predominante ou a única, levando a crer que TcI, apesar de não estar associado às megasíndromes, pode desencadear a casos de gravidade muito severa Miles *et al.*, (1981b, 2003); Añez *et al.*, (2004); Ruíz-Sánchez *et al.*, (2005); Samudio *et al.*, (2007). Esta comprovação nos obriga a uma rigorosa investigação e seguimento dos casos de DCA na Amazônia, como temos realizado a partir dos estudos em colaboração com Pinto *et al.*, (2010), objetivando um prognóstico favorável destes pacientes. Por outro lado, os casos crônicos da Região são raros, Valente V *et al.* (1997) relataram um caso de megacólon chagásico autóctone do Estado do Pará. Mais tarde, a genotipagem do isolado de *T. cruzi* deste paciente (dados não publicados) foi confirmada como TcI. Outros casos de DC caracterizados na fase crônica não foram genotipados Vinas-Albajar *et al.* (2003); Xavier *et al.* (2006); Aguilar *et al.* (2007) impossibilitado fazer associações entre linhagens específicas de *T. cruzi*, vias de transmissão e hospedeiros (Coura, 2007).

A utilização de marcadores de microsátélites vem sendo aplicada em estudos de polimorfismo intralinhagens de *T. cruzi*, sobretudo populações de TcI que apresenta elevado polimorfismo. Ocaña-Mayorga *et al.* (2010) trabalharam na Província de Loja no sul do Equador com marcadores de microsátélites para 10 loci, caracterizando isolados de triatomíneos, mamíferos e do homem que participam do ciclo de transmissão silvestre, peridoméstico e doméstico. O estudo concluiu que dois diferentes grupos de TcI circulavam independentemente entre os distintos ciclos de transmissão, com evidências de dispersão antropogênica de parasitos entre as comunidades e de recombinação entre genótipos distintos de TcI. Esta informação é de grande utilidade para a concepção de programas de controle no sul do Equador e em outras localidades de grande prevalência de *T. cruzi* TcI.

Herrera *et al.* (2007) e Cura *et al.* (2010) estudaram genótipos de *T. cruzi* TcI de diferentes ciclos de transmissão na América Central e do Norte com base em sequências do espaçador intergênico do gene SL. Esses estudos definiram haplótipos distintos de TcI (Ia-Ic) associados a diferentes ciclos de transmissão: Tc Ia domésticos do sul e norte da América do Sul e silvestres na América Central e do Norte. Tc Ib foi encontrado em todos os ciclos de transmissão da Colômbia. Tc Ic foi identificado em todos os ciclos de transmissão da Argentina e da Colômbia, incluindo pacientes com miocardiopatia chagásica, amostras silvestres brasileiras e casos humanos da Guiana Francesa, Panamá e Venezuela. Tc Id reuniu cinco amostras de *T. infestans* doméstico do norte da Argentina, nove amostras silvestres de *Mepraia spinolai* e *Mepraia gajardoi* e dois pacientes chagásicos do Chile e um da Bolívia, com um paciente de reativação chagásica. Infecções mistas por Tc Ia+Tc Ic, Tc Ia + Tc Id e Tc Ic + Tc Id foram detectados em fezes de vetor e isolados de amostras humanas.

Em recente trabalho, Tomasini *et al.* (2011) também utilizando microsátélites e sequenciamento da Região intergênica do gene SL (SL-IR) mostraram que populações de TcI de distribuição geográfica limitada na província do Chaco (Argentina) podem ser diferenciadas em oito genótipos agrupados em quatro grupos. Um deles foi classificado dentro do haplótipo anteriormente descrito como Ia e outro como Ic. Considerando a presença de alinhamentos ambíguos na Região de microsátélites de SL-IR e polimorfismo de cópias do IR-SL, que podem afetar a topologia da árvore e as relações entre os grupos, a análise de população de TcI baseada nessa metodologia foi questionada pelos autores, uma vez que pode induzir em equívocos de inferência filogenética.

Estudos em andamento sugerem uma relevante diversidade genética entre isolados TcI da Amazônia Brasileira, Llewellyn *et al.* (2009b) analisaram isolados TcI por microsatélite dentro de um único hospedeiro reservatório com nove marcadores polimórficos microsatélites em 211 clones de oito mamíferos de três diferentes focos silvestres na América do Sul. Este trabalho, somado ao de Miles (2009) revelam a fascinante diversidade genética desta linhagem de *T. cruzi* na Amazônia e devem nortear as pesquisas sobre sua interação com os ciclos de transmissão envolvendo o homem.

Diante dos estudos realizados e dos resultados apresentados observa-se que a linhagem Tc1 é de fato a mais prevalente nos casos humanos de DCA da Amazonia brasileira, sendo também muito prevalente em animais silvestres, especialmente didelfídeos e macacos, e espécies de *Rhodnius sp.* Entretanto, estudos futuros utilizando outros marcadores (microsatélites e haplótipos) que caracterizam genótipos intra-linhagens de Tc1 poderão esclarecer os ciclos de *T. Cruzi* na Região. Acreditamos que os resultados obtidos com isolados de *T. cruzi* na Região deu uma grande contribuição ao conhecimento das linhagens que circulam nesse ambiente, distribuição, associação com hospedeiros e ecótopos, infecção no homem e relação com a morbimortalidade da DC, em conjunto, esses dados são de grande importância para os estudos da doença na Amazônia.

7. CONCLUSÕES

Basead nas eco-epidemiológicas e molecular nas localidades selecionadas para estudos é possível concluir que:

- Todos os casos humanos no Estado do Pará foram caracterizados como positivos por exame parasitológico. Nem todos os casos de Santana, Amapá, apresentaram casos parasitológicos positivos, face à demora do diagnóstico. Todos os casos nos dois estados foram definidos como DCA.
- Exames indiretos como xenodiagnóstico e hemocultura e o de concentração, QBC®, foram úteis para detectar tripanossomas do que a gota espessa.
- A sorologia por HAI e IFI (IgG e IgM) foi eficiente para detectar os casos agudos nos dois estados, mesmo considerando-se tempos distintos para detecção de anticorpos durante o curso da infecção.
- A participação de mamíferos silvestres infectados no entorno da residência dos pacientes sustenta a importância dos animais, sobretudo de *D. marsupialis*, com consideráveis taxas de infecção para *T. cruzi*.
- Triatomíneos de seis espécies infectadas, principalmente *R. pictipes* e *P. geniculatus* têm importância na transmissão da doença de Chagas aguda e estão associados à transmissão.
- Apesar de na Amazônia circularem vários genótipos de *T. cruzi*, nos pacientes, mamíferos e triatomíneos silvestres deste trabalho foi identificada somente a linhagem TCI de *T. cruzi*, a mais predominante na Região.
- Em São Luís, Estado do Maranhão, apesar de não ter registro de casos humanos de doença de Chagas, apresenta um ciclo domiciliar associados a rato doméstico e o triatomíneo da espécie *T. rubrofasciata*, e um ciclo silvestre mantido por didelfídeos. Nos dois ciclos circulam a linhagem TCI de *T. cruzi*.
- Estudos com marcadores de maior resolução com isolados de *T. cruzi* regionais podem ajudar a esclarecer os ciclos de transmissão, as rotas de contaminação e os hospedeiros envolvidos em casos de DCA na Amazônia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD-FRANCH, F.S., PALOMEQUE, H., AGUILAR, M.V., MILES, M.A. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. **Tropical Medicine and International Health** 10(12):1258–1266, 2005.
- ABAD-FRANCH, F., MONTEIRO, F.A. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 30:102 Suppl 1:57-70, 2007.
- ABAD-FRANCH, F., MONTEIRO, F.A., JARAMILLO, O.N., GURGEL-GONÇALVES, R., DIAS, F.B., DIOTAIUTI, L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). **Acta Tropica** 110(2-3):159-77, May-Jun 2009.
- ABAD-FRANCH, F., FERRAZ, G., CAMPOS, C., PALOMEQUE, F.S., GRIJALVA, M.J., AGUILAR, H.M., MILES, M.A. Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: infestation of Amazonian palm trees by triatomine bugs at three spatial scales. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 2;4(3):e620, Mar 2010.
- ACOSTA, L., ROMANHA, A.J., COSENZA, H., KRETTLI, A.U. Trypanosomatid isolates from Honduras: differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 1991 Jun;44(6):676-83.
- AFCHAIN, D., LE RAY, D., FRUIT, J., CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. **Journal of Parasitology** 65(4): 507-514, 1979.
- AGABIAN N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**. 61 (7):1157-60, 1990.
- AGUILAR, M. & YÉPEZ, R. Evolución epidemiológica de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. **Proceedings of the International Workshop on Populations Genetics and Control of Triatominae**, Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, 24-28 September, (1):30-38, 1995.
- AGUILAR, H.M., ABAD-FRANCH, F., DIAS, J.C., JUNQUEIRA, A.C.V., COURA, J.R. Chagas disease in the Amazon region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 102 (Suppl1):47-56, 2007.
- ALEIXO, D.L., FERRAZ, F.N., DE MELO, C.S., GOMES, M.L., TOLEDO, M.J., KANESHIMA, E.N., BERSANI-AMADO, C.A., ARAÚJO, S.M. Changes of RAPD profile of *Trypanosoma cruzi* II with Canova and Benznidazole. **Homeopathy** 97(2):59-64, Apr 2008.
- ALMEIDA, F.B. Triatomíneos da Amazônia: encontro de três espécies naturalmente infectadas por *Trypanosoma* semelhante ao *cruzi* no Estado do Amazonas (*Hemiptera: Reduviidae*). **Acta Amazonica** 1(1): 89-93, 1971.

- ALMEIDA, F.B., MACHADO, P.A. Sobre a infecção do *Panstrongylus geniculatus* pelo *Trypanosoma cruzi* em Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica** 1(2):1-75, 1971.
- ALVES, J.J.A. Geoeecologia da Caatinga No Semi-Árido do Nordeste Brasileiro. **Climatologia e Estudos da Paisagem Rio Claro**, vol 2,n 1, janeiro/junho, p. 58-71, 2007.
- AMÚNARRIZ, M., CHICO, M.E., GUDERIAN, R.H. Chagas' disease in Ecuador: a sylvatic focus in the Amazon region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 94:145-149, 1991.
- ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). **Revista de Patologia Tropical** 3:65-121, 1974.
- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV- A reconsideration of it systematic position. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 77: 405-415, 1982.
- AÑEZ, N., CARRASCO, H., PARADA, H., CRISANTE, G., ROJAS, A., GONZALEZ, N., RAMIREZ, J.L., GUEVARA, P., RIVERO, C., BORGES, R., SCORZA, J.V. Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 60(2):215-22, 1999.
- AÑEZ, N., CRISANTE, G., DA SILVA, F.M., ROJAS, A., CARRASCO, H., UMEZAWA, E.S., STOLF, A.M., RAMIREZ, J.L., TEIXEIRA, M.M. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. **Tropical Medicine International Health** 9:1319-26, 2004.
- ANÔNIMO. Recommendations from a Satellite Meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94: 429-432, 1999.
- ARAÚJO, C.A., WANIEK, P.J., JANSEN, A.M. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. **Vector Borne Zoonotic Disease** 9(3):227-34, Jun 2009.
- BAPTISTA, C.S., VÊNCIO, R.Z., ABDALA, S., CARRANZA, J.C., WESTENBERGER, S.J., SILVA, M.N., PEREIRA, C.A., GALVÃO, L.M., GONTIJO, E.D., CHIARI, E., STURM, N.R., ZINGALES, B. Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. **Molecular and Biochemical Parasitology** 150(2):236-48, Dec 2006.
- BARATA, J.M.S., ROCHA, R.M., RODRIGUES, V.L.C.C., FERRAZ FILHO, A.M. Primeiro caso autóctone de tripanossomíase americana do Estado do Acre (Brasil) e sua correlação com as cepas isoladas do caso humano e de triatomíneos silvestres da área. **Revista de Saúde Pública** 22: 401-410, 1988.
- BARBOSA, P.R.B. The oral transmission of Chagas disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal Cardiology** 112:132-133, 2006.

- BARNABÉ, C., NEUBAUER, K., SOLARI, A., TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi* presence of the two major phylogenetic lineages and of several lesser discrete typing units (DTUs) in Chile and Paraguay. **Acta Tropica** **78**(2): 127-37, 2001.
- BARRETT, T.V., HOFF, R., MOTT, K.E., GUEDES, F., SHERLOCK, I.A. An outbreak of acute Chagas's disease in the São Francisco Valley region of Bahia, Brazil: triatomine vectors and animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**. **73**(6):703-9, 1979.
- BARRETT, T.V., HOFF, R.H., MOTT, K.E., MILES, M.A., GODFREY, D.G., TEIXEIRA, R., ALMEIDA DE SOUZA, J.A., SHERLOCK, I.A. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene** **74**(1):84-90, 1980.
- BARRETT, T.V., GUERRERO, J.H.G. Os triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) em relação à doença de Chagas na Amazônia. **Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia: Fatos e Perspectivas** Manaus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 119-130, 1991.
- BASTOS, C.J., ARAS, R., MOTA, G., REIS, F., DIAS, J.P., DE JESUS, R.S., FREIRE, M.S., DE ARAÚJO, E.G., PRAZERES, J., Grassi, M.F. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases** **15**;4(6):e711, Jun 2010.
- BELTRÃO, H.D.E.B., CERRONI, M.D.E.P., FREITAS, D.R., PINTO, A.Y., VALENTE, V.C., VALENTE, S.A., COSTA, E.G., SOBEL, J. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. **Tropical Doctors** **39**(4):231-2, Oct 2009.
- BORBOREMA, M., GUERRA, J., MALHEIROS, R., FÉ, N., LACERDA, M.G., MOURÃO, M.P.G., COELHO, L.I., MACÊDO, V., COURA, J.R., JUNQUEIRA, A. Doença de Chagas urbana em Tefé (AM): relato de nove casos com suspeita de transmissão oral. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41, Encontro de Medicina Tropical do Cone Florianópolis/SC 2005, Florianópolis, **Resumos**. Florianópolis: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2005, Tema Livre, p. 491.
- BOSSENO, M.F., BARNABÉ, C., SIERRA, M.J., KENGNE, P., GUERRERO, S., LOZANO, F., EZEQUIEL, K., GASTÉLUM, M., BRENIÈRE, S.F. Wild ecotopes and food habits of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **80**(6):988-91, Jun 2009.
- BRAGA, M.V. & LIMA, M.M. Feeding and Defecation Patterns of Nymphs of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera: Reduviidae), and its Potential Role as Vector for *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **94**(1):127-9, 1999.

- BRANCHE, C., OCHAYA, S., ASLUND, L., ANDERSSON, B. Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Biochemical Parasitology** **147**(1):30-8, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Inquérito Sorológico para avaliação do Programa de Controle da doença de Chagas, Normas Técnicas**. Brasília: FUNASA, p. 69-69, 1994.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. **38**, Suplemento 3, 2005. p. 30.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Recursos Hídricos. **Atlas das áreas suscetíveis à desertificação do Brasil**. Brasília: MMA, 200.p. 34, 2007.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS (Serie de Manuais Técnicos, 12), 2009. 92 p.
- BRASILEIRO, R.S. Alternativas de desenvolvimento sustentável no semiárido nordestino: da degradação à conservação. **Scientia Plena** v. 5, N. 5, 2009.
- BRENER, Z., GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, **114**, (2):103-10, 1997.
- BRENIERE, S.F., BARNABÉ, C., BOSSENO, M.F., TIBAYRENC, M. Impact of number of isoenzyme loci on the robustness of intraspecific phylogenies using multilocus enzyme electrophoresis: consequences for typing of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, **127**:273-81, 2003.
- BRICEÑO-LEÓN, R. Chagas disease in the Americas: an ecohealth perspective. **Cadernos de Saúde Pública** **25** (Suppl 1):71-82, 2009.
- BRISSE, S., BARNABÉ, C., TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal Parasitology** **30**:35-44, 2000a.
- BRISSE, S., DUJARDIM, J.C., TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterized amplified region markers. **Molecular Biochemical Parasitology** **111**: 95-105, 2000b.
- BRISSE, S., VERHOEF, J., TIBAYRENC, M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **International Journal of Parasitology** **31**:1218-1226. 2001.
- BRISSE, S., HENRIKSSON, J., BARNABE, C., DOUZERY, E.J., BERKVENS, D., SERRANO, M., DE CARVALHO, M.R., BUCK, G.A., DUJARDIN, J.C., TIBAYRENC, M. Evidence for genetic exchange

and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infection Genetics and Evolution** 2: 173-183. 2003.

BRUMPT, E. **Précis de Parasitologie**, Paris, masson, Tome I, 1931.

BURGOS, J.M., BEGHER, S., SILVA, H.M., BISIO, M., DUFFY, T., LEVIN, M.J., MACEDO, A.M., SCHIJMAN, A.G. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene** 78(2):294-7, 2008.

BURMEISTER, H. **Handbuch der Entomologie**. Berlin, vol.2, part 1, iv + 400 + 4 pp, 1835.

BUSCAGLIA, C.A., DI NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes Infectology** 5(5):419-27. 2003.

CALZADA, J.E., PINEDA, V., GARISTO, J.D., SAMUDIO, F., SANTAMARÍA, A.M., SALDAÑA, A. Human trypanosomiasis in the eastern region of the Panama Province: new endemic areas for Chagas disease. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene** 82: 580-582, 2010.

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

CARBAJAL DE LA FUENTE, A.L., MINOLI, S.A., LOPES, C.M., NOIREAU, F., LAZZARI, C.R., LORENZO, M.G. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. **Acta Tropica** 101: 115-119, 2007.

CARCERES, C. D., NICHOLIS, S., CORREDOR, A., GUALDRÓN, L., SLAIT, E., DIB, J. C., ARIZA, K. Investigación de un brote de síndrome febril con miocarditis aguda en Guamal, Magdalena, 7 a 11 de junio de 1999. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional, **Instituto Nacional de Salud, Santa Fé de Bogotá**, Colombia, n.412, p. 180-186, 1999.

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

CARDOSO, F.A. Sur le mecanisme de la transmission de la maladie de Chagas. **Annals Parasitology. Human. Compartive** 16: 341-349, 1933.

CARPINTERO, D.J. Proposición para la investigación de puerta de entrada desconocida em enfermedad de Chagas – Mazza. **Gazeta Veterinaria** 40(330): 280, 1978.

CARRASCO, H.J., TORRELLAS, A., GARCÍA, C., SEGOVIA, M., FELICIANGELI, M.D. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus*

- geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan Oistrict) and neighboring States, Venezuela. **International Journal Parasitology** 35(13):1379-84,2005.
- CASTRO, M.C., BARRETT, T.V., SANTOS, W.S., ABAD-FRANCH, F., RAFAEL, J.A. Attraction of Chagas disease vectors (Triatominae) to artificial light sources in the canopy of primary Amazon rainforest. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 105(8):1061-4, 2010
- CEBALLOS, L.A., CARDINAL, M.V., VAZQUEZ-PROKOPEC, G.M., LAURICELLA, M.A., OROZCO M.M., CORTINAS, R., SCHIJMAN, A.G., LEVIN, M.J., KITRON, U., GÜRTLER R.E. Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. **Acta Tropica** 98(3):286-96, 2006.
- CHAGAS, C. Nova Trypanozomíase Humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. nsp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 1:159-218, 1909.
- CHAGAS, C. Sobre a verificação do "*Trypanosoma cruzi*" em macacos do Pará. **Science Reports of the Research Institute Tohoku, University.ser.C:Medicine** 2:75-77, 1924a. Nota prévia.
- CHAGAS, C. Infection naturelle des singes du Pará (*Chrysothrix sciureus* L.) par *Trypanosoma cruzi*. **C. R. Soc. Biol. Paris** 90: 873-876, 1924b.
- CHAPMAN, M., BAGGLEY, R., GODFREY-FAUSSET, P., MALPAS, T., WHITE, G., CANESE, J. AND MILES, M. (1984). *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. **Journal of Protozoology** 31, 482-486.
- CLICK LAMBERT, R., KOLIVRAS, K.N., RESLER, L.M., BREWSTER, C.C., PAULSON, S.L. The potential for emergence of Chagas disease in the United States. **Geospatial Health** 2(2):227-39, 2008.
- CORREA, R. R. & H. N. ESPINOLA. Descrição de *Triatoma pseudomaculata*, nova espécie de triatomíneo de Sobral, Ceará (Hemiptera, Reduviidae). **Arquivos de Higiene e Saúde Pública de São Paulo** 29:115-127, 1964.
- CORTEZ, A.P., VENTURA, R.M., RODRIGUES, A.C., BATISTA, J.S., PAIVA, F., ANEZ, N., MACHADO, A.L., GIBSON W.C., TEIXEIRA, M.M.G. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa **Parasitology** 133(2):159-69. 2006.
- COURA, J.R. Relatório apresentado ao Instituto Nacional de Endemias Rurais, **Ministério da Saúde**, sobre surto de doença de Chagas Aguda ocorrido em Teutônia, Município de Estrela, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, 1966.
- COURA, J.R. Chagas, disease as endemic to the Brazilian Amazon: risk or hypotesis? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 23: 67-70, 1990.

- COURA, J.R., BARRET, T.V., NARANJO, M.A. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 27:251-253, 1994.
- COURA, J.R., NARANJO, M.A., WILLCOX, H.P.F. Chagas' disease in the Brazilian Amazon, III. A cross-sectional study - A short revision. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 37(2): 103-107. 1995.
- COURA, J.R., FERNANDES, O., ABOLEDA, M., BARETT, T.V., CARRARA, N., DEGRAVE, W., CAPMBELL, D.A. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 90:278-279. 1996.
- COURA, J.R. Mecanismo de transmissão da infecção chagásica ao homem por via oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 23: 45-47, 1997.
- COURA JR, JUNQUEIRA AC, BOIA MN, FERNANDES O. Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94(Suppl 1):379-84, 1999.
- COURA, J.R., JUNQUEIRA, A.C.V., FERNANDES, O., VALENTE, S.A.S., MILES, M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology** 18(4):171-176, 2002a.
- COURA, J.R., JUNQUEIRA, A.C., BOIA, M.N., FERNANDES, O., BONFANTE, C., CAMPOS, J.E., SANTOS, L., DEVERA, R. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 4(3):59-65. 2002b.
- COURA JR. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39 (Suppl 3):113-7, 2006.
- COURA, J.R. Chagas Disease: What is known and what is needed - A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 102(Suppl.1):113-122, 2007.
- COVARRUBIAS, C., CORTEZ, M., FERREIRA, D., YOSHIDA N. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. **International Journal for Parasitology** 37(14):1609-16, 2007.
- CRESCENTE, J A., VALENTE, S.A.S., VALENTE, V.C., ARAÚJO, J.E.A. Ocorrência de 4 novos casos agudos de doença de Chagas na Vila de Icoaraci, PA. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXVIII, 1992, Belém - Pará, **Programa e Resumos dos Temas Livres e Pôsters**. p.29, Belém – Pará: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1992 Tema Livre nº 062.
- CRESPO, F.G., QUISPE, R.R., COUTO, R.D.I., GALLIEZ, R.M., AGUIAR, F.M., QUIROGA, M.M., MASCHERETTI, M., BOULOS, M. Surto de doença de Chagas aguda em Mojuí dos Campos, Pará: manifestações clínicas e laboratoriais. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,

- XLIII, 2007, Campos do Jordão-SP, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40: p.28.
- CURA, C.I., MEJÍA-JARAMILLO, A.M., DUFFY, T., BURGOS, J.M., RODRIGUERO, M., CARDINA, L.M.V., KJOS, S., GURGEL-GONÇALVES, R., BLANCHET, D., DE PABLOS, L.M., TOMASINI, N., DA SILVA, A., RUSSOMANDO, G., CUBA, C.A., AZNAR, C., ABATE, T., LEVIN, M.J., OSUNA, A., GÜRTLER, R.E., DIOSQUE, P., SOLARI, A., TRIANA-CHÁVEZ, O., SCHIJMAN, A.G. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. **International Journal of Parasitology**. 2010 Dec;40(14):1599-607.
- D'AVILA, D.A., MACEDO, A.M., VALADARES, H.M., GONTIJO, E.D., DE CASTRO, A.M., MACHADO, C.R., CHIARI, E., GALVÃO, L.M. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. **Journal of Clinical Microbiology** 47(6):1718-25, 2009.
- DAVIS, D.S., RUSSEL, L.H., ADAMS, L.J. An experimental infection of *Trypanosoma cruzi* in striped skunks (*Mephitis mephitis*). **Journal of Wildlife Diseases** 16(3):403, 1980.
- DAVIS R.E. Spliced Leader RNA trans splicing in Metazoa. **Parasitology Today** 12:33-40, 1996.
- DEANE, L. & JANSEN, G. Encontro de *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909) em marsupiais da espécie *Marmosa cinerea* (Desmarest). **Brasil Médico** 53(7):265-266, 1939.
- DEANE, M.P. Ocorrência do *Trypanosoma conorrhini* em "barbeiros" e em ratos na cidade de Belém, Pará, e seu cultivo em meio NNN. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública** 1:433-444, 1947.
- DEANE, L.M. Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres no Estado do Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 3(1):15-28, 1961a.
- DEANE, L.M., DAMASCENO, R.G. Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. II. Tripanosomas de macacos da Zona do Salgado, Estado do Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 3(2): 61-70, 1961b.
- DEANE, L.M. Inquérito de Toxoplasmose e de Tripanosomíase realizado no Território do Amapá pela III Bandeira Científica do Centro Acadêmico "Oswaldo Cruz" da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Revista de Medicina** 47(1): 1-12, 1963.
- DEANE, L.M. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** 16(1): 27-48. 1964a.
- DEANE, L.M. Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica III. Hemoscopia e xenodiagnóstico de animais silvestres dos arredores de Belém, Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 6: 225-232, 1964b.

- DEANE, L.M. Inquérito de Toxoplasmose e de Tripanosomíase realizado em Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó, Pará, pela V Bandeira Científica do Centro Acadêmico Oswaldo Cruz da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Revista de Medicina** 48: 107-116, 1964c.
- DEANE, L.M. Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica IV. Hemoscopia e xenodiagnóstico de animais silvestres da Estrada Belém-Brasília. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 9: 143-148, 1967.]
- DEANE, L.M., BATISTA, D., FERREIRA NETO, J.A.S. [Trypanosomas of mammals of the Amazon region. V. *Trypanosoma lambrechtii* Marimkelle, 1968, in monkeys of the State of Amazon, Brazil] **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 12(1):1-7, 1970.
- DEANE, M.P., LENZI, H.L., JANSEN, A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 79(4):513-5, 1984.
- DE GEER, C. (1773). **Memories pour Servir à l'histoire des Insects**, Vol.3. Pierrer Hesselberg, Stockholm, p. 696.
- DEVERA, R., FERNANDES, O., COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98(1):1-12. 2003.
- DE NOYA, A.B., DÍAZ-BELLO, Z., COLMENARES, C., RUIZ-GUEVARA, R., MAURIELLO, L., ZAVALA-JASPE, R., SUAREZ, J.A., ABATE, T., NARANJO, L., PAIVA, M., RIVAS, L., CASTRO, J., MÁRQUES, J., MENDOZA, I., ACQUATELLA, H., TORRES, J., NOYA O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **The Journal of Infection Disease** 1;201(9):1308-15, 2010.
- DIAS JCP. Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo-epidemiológico a partir da fase aguda, ente 1940 a 1982. [Tese de doutorado]: Rio de Janeiro; Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1982.
- DIAS, J.C., PRATA, A., SCHOFIELD, C.J. [Chagas' disease in the Amazon: an overview of the current situation and perspectives for prevention] **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 35(6):669-78. 2002a.
- DIAS, J.C.P., SILVEIRA, A.C., SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 97(5):603-12. 2002b.
- DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 22(10):2020-2021, out, 2006a.

- DIAS J.C. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39(4):370-5, 2006b.
- DIAS, J.C.P., PRATA, A.R., CORREA, D., CUNALI, V.C.A. Análise preliminar da Avaliação Clínica de Indivíduos estudados no Inquérito Nacional de Prevalência da Doença de Chagas no Brasil (2002-2007). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40(Supl. 3): 35-38, 2007.
- DIAS J.C, PRATA A, CORREIA D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(2):193-198, 2008a.
- DIAS, J.C.P., BASTOS, C., ARAÚJO, E., MASCARENHAS. A.V., MARTINS NETTO, E., GRASSI, F., SILVA, M., TATTO, E., MENDONÇA, J., ARAÚJO, R.F., SHIKANAI-YASUDA, M.A., ARAS, R. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(3):296-300, 2008b.
- DIAZ UNGRÍA, C. Transmisión experimental del *Trypanosoma cruzi* en los vertebrados: la contaminación bucal a partir de heces de *Rhodnius prolixus*. **Revista Veterinaria Venezolana** 16(95): 341, 1964.
- DIAZ UNGRÍA, C. La via bucal en la transmisión de las tripanosomiasis animales. **Boletín de la Academia de Ciencias Físicas e Matemática e Naturales** 27(74) 33. 1967.
- DIAZ UNGRÍA, C. La contaminación por vía buco-gástrica e ocular en los tripanosomas. **Revista de la Universidad de Zulia**, 41: 45, 1968.
- DIAZ UNGRÍA, C. La mosca domestica como transmisora del *Trypanosoma cruzi*. **Revista de la Universidad del Zulia**, 114: 44-47, 1969.
- DIAZ UNGRÍA, C., SOTO BRACHO, J. Camino que sigue el *Trypanosoma cruzi* en perros infectado por la via bucal: nuevos estudios. **Revista Veterinaria Venezolana** 29(171): 271, 1970.
- DIAZ UNGRÍA, C., ZEUSS, M. Transmisión del *Trypanosoma evansi* y del *Trypanosoma cruzi* a partir de heces de animais infectados por via bucal. **Revista Veterinaria Venezolana** 30(176): 187, 1971.
- DIB, J., BARNABE, C., TIBAYRENC, M., TRIANA, O. Incrimination of *Eratyrus cuspidatus* (Stal) in the transmission of Chagas' disease by molecular epidemiology analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted area in the north of Colombia. **Acta Tropica** 111(3):237-42, 2009.
- DONELSON, J.E. & ZENG W. A comparison of trans-RNA splicing in trypanosomes and nematodes. **Parasitology Today** 6(10):327-34, 1990.
- DOREA R.C.C. Doença de Chagas na Amazônia: aspectos epidemiológicos regionais e considerações

a propósito de um caso pediátrico. **Hiléia Medica** 3(2):81-109, 1981.

DOS SANTOS, C.B., FERREIRA, A.L., LEITE, G.R., FERREIRA, G.E., RODRIGUES, A.A., FALQUETO A. Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 2005 Aug;100(5):471-3, 2005.

DRUMOND, J.A.G. & MARCOPITO, L.F. Migração interna e a distribuição da mortalidade por doença de Chagas, Brasil, 1981/1998. **Cadernos de Saúde Pública** 22(10):2131-2140, 2006.

DUJARDIN, J.P., FORGUES, G., TORREZ, M., MARTINEZ, E., CORDOBA, C., GIANELLA, A. Morfometrics of domestic *Panstrongylus rufotuberculatus* in Bolivia. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology** 92(2):219-28, 1998.

FERNANDES. O., DEGRAVE, W., CAMPBELL, D.A. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. **Parasitology**. 107 (Pt 3):219-24, 1993.

FERNANDES O, MURTHY VK, KURATH U, DEGRAVE WM, CAMPBELL DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Molecular and Biochemical Parasitology** 66:261-71, 1994.

FERNANDES, O., TEIXEIRA, M.M.G., STURM, N.R., SOUSA, M.A., CAMARGO, E.P., DEGRAVE. W.M., CAMPBELL, D. Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. **The Journal of Eukariotic and Microbiology** 44:535-9. 1997

FERNANDES, O., STURM, N.R., DERRE R, C.D.A. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 1;95(1):129-33, 1998.

FERNANDES, O., SANTOS, S., JUNQUEIRA, A., JANSEN, A., CUPOLILLO, E., CAMPBELL, D., ZINGALES, B., COURA, J. R. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94:195-197, 1999a.

FERNANDES, O., MANGIA, R.H., LISBOA, C.V., PINHO, A.P., MOREI, C.M., ZINGALES B. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of mini-exon gene. **Parasitology** 118:161-6, 1999b.

FERNANDES, O., SANTOS, S., CUPOLILLO, E., MENDONÇA, B., DERRÉ, R., JUNQUEIRA, A., SANTOS, L., STURM, N., NAIFF., R., BARRET, T., CAMPBELL, D., COURA, J.R. Trypanosomiasis in the Brazilian Amazon: a mini-exon multiplex PCR to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 95: 97-99, 2001.

FERREIRA, L.C. & DEANE, L. Novo depositário do *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909): a irara *Tayra barbara* (L.). **Brasil Médico** Rio de Janeiro, 52: 1159-1161, 1938a.

- FERREIRA, L.C., DEANE, L. Infecção experimental de *Rhodnius pictipes* STÅL, 1872, pelo *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909). **Brasil Médico**, Rio de Janeiro, **52**(49): 1181. 1938b.
- FITZPATRICK, S., FELICIANGELI, M.D., SÁNCHEZ-MARTÍN, M., MONTEIRO, F.A., MILES, M.A. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. **PLoS Neglected Tropical Diseases** **2**: e210, 2008.
- FLOCH, H. & TASQUÉ, P. Un cas de maladie de Chagas en Guyane Française. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique** **34**(4-7): 137, 1941.
- FLOCH, H. & CAMAIN, R. Deux nouveaux cas de maladie de Chagas en Guyane Française. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique** **34**(5-6): 347-350, 1948.
- FORATTINI, O.P. Biogeografia, origem e distribuição de triatomíneos no Brasil. **Revista de Saúde Pública de São Paulo** **14**: 265-299, 1980.
- FRAIHA NETO, H., VALENTE, S.A.S., VALENTE, V.C., PINTO, A.Y.N. Doença de Chagas - Endêmica na Amazônia? **Anais da Academia de Medicina do Pará** **6**: 53-57. 1995.
- FRANÇA, MS., FRADE, J.M., KONASUGAWA, K., ALMEIDA, F.B. Doença de Chagas primeiro caso autóctone da Amazônia ocidental - Amazonas - Brasil. **Acta Amazônica** **10**(4):759-762, 1980.
- FREITAS J.M., AUGUSTO-PINTO, L., PIMENTA, J.R., BASTOS-RODRIGUES, L., GONÇALVES, V.F., TEIXEIRA, S.M., CHIARI, E., JUNQUEIRA, A.C., FERNANDES, O., MACEDO, A.M., MACHADO, C.R., PENA, S.D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens** **2**(3):e 24, 2006 Mar.
- FRANK, F.M., FERNANDEZ, M. , TARANTO, N.J., CAJAL, S.P., MARGNI, R.A., CASTRO, E., THOMAZ-SOCCOL, V., MALCHIODI, E.L. Characterization of human infection by *Leishmania ssp* in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. **Parasitology** **126**:31-39, 2003.
- GALVÃO, C., CARCAVALLO, R., ROCHA, D.S., JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa** **202**:1-36, 2003.
- GARZON E.A., BARNABE, C., CORDOVA, X., BOWEN, C., PAREDES, W., GOMEZ, E., OUAISSI, A., TIBAYRENC, M., GUEVARA, A.G. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **96**(4):378-82, 2002.
- GAUNT, M., MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **95**(4):557-565, 2000.

- GIBSON W, BINGLE L, BLENDAMAN W, BROWN J, WOOD J, STEVENS J. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcripts. **Molecular and Biochemical Parasitology** **107**:269-77, 2000.
- GOMES, A., F. Transmissão experimental do *Trypanosoma cruzi* em camundongos pelo pernilongo *Culex fatigans*. **O Hospital** **69**(1): 27, 1966.
- GOMES, Y.M., LORENA, V.M., LUQUETTI, A.O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **104**(Supl 1):115-21, 2009 Jul.
- GURGEL-GONÇALVES, R., ABAD-FRANCH, F., FERREIRA, J.B.C., SANTANA, D.B., CUBA CUBA, C.A. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? **Acta Tropica** **107**: 90-98, 2008.
- GÜRTLER, R.E., SEGURA, E.L., COHEN, J.E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerging Infectious Diseases** **9**(1):29-32, 2003.
- GUTIERREZ, R., ANGULO, VM., TARAZONA, Z., BRITTO, C., FERNANDES, O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. **Parasitology** **129**:439-444, 2004.
- HARRIS, E., KROPP, G., BELLI, A., RODRIGUEZ, B., AGABIAN N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **The Journal of Clinical and Microbiology** **36**(7):1989-95, 1998.
- HASSAN, M.Q., GHOSH, A., GHOSH. S.S., GUPTA, M., BASU, D., MALLIK, K.K., ADHYA, S. Enzymatic amplification of mini-exon- derived RNA gene spacers of *Leishmania donovani*: primers and probes for DNA diagnosis. **Parasitology** **107**(5):509-17, 1993.
- HENRIKSSON, J., DUJARDIN, J.C., BARNABE, C., BRISSE, S., TIMPERMAN, G., VENEGAS, J., PETTERSSON, U., TIBAYRENC, M., SOLARI, A. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. **Parasitology** **124**(Pt 3):277-86, 2002
- HERRERA, L. & URDANETA-MORALES, S. Synanthropic rodent reservoirs of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in the valley of Caracas, Venezuela. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **39**(5):279-82, 1997 Sep-Oct.
- HERRERA, L., DAS CHAGAS, M., XAVIER, S., VIEGAS, C., MARTINEZ, C., COTIAS, P.M., CARRASCO, H., URDANETA-MORALES, S., JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). **Experimental Parasitology** **107**(1-2): 78-88. 2004.
- HERRERA, C., BARGUES, M.D., FAJARDO, A.R., MONTILLA, M., TRIANA, O., VALLEJO, G.A., GUHL F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. **Infections Genetics Evolution** **7**:535-9. 2007.

- HERRERA, H.M., RADEMAKER, V., ABREU, U.G., D'ANDREA, P.S., JANSEN, A.M. Variables that modulate the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. **Acta Tropica**, **102**(1):55-62. 2007.
- IBGE. **Perfil dos municípios brasileiros**, Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/perfilmunic/2005/default.shtm>> Acesso em: 04/11/2005.
- JANSEN, A.M., SANTOS DE PINHO, A.P., LISBOA, C.V., CUPOLILLO, E., MANGIA, R.H., FERNANDES, O. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **194**(1):203-4, 1999.
- JUNQUEIRA, A.C., DEGRAVE, W., BRANDAO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends in Parasitology** **21**(6):270-2, 2005.
- KJOS, S.A., SNOWDEN, K.F., OLSON, J.K. Biogeography and *Trypanosoma cruzi* Infection Prevalence of Chagas Disease Vectors in Texas, USA. **Vector Borne Zoonotic Disease** [Epub ahead of print] 2008.
- KLUG, J.C.F. In: Meyen, F.J.F. Reise um die Erde, in **Den Jahren 1830, 1831, und 1832**, ausgeführt von F.J.F. Meyen. C.W. Eichhoff, Berlin, 1834.
- KOFOID, C.A., DONAT, F. Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* from the intestine of cone-nose bug: *Triatoma protracta*. **Proceedings of Society Experimental Biology** **30**: 489-491, 1933.
- LACERDA, J.R., FARIA, J.I.M., MATTE, J.R., COSTA, R., SALGADO, A., MOURÃO, O., SANTOS, C.A.B., NOHMI, N. Doença de Chagas: registro do primeiro diagnóstico feito no homem, no Território Federal do Amapá. In: Congresso Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 10°, 1974, Curitiba. **Programa e sumários**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/Secretaria da Saúde do Estado do Paraná, 1974. Res. n° 32.
- LACERDA, M., BORBOREMA, M., DAMIAN, M., MALHEIROS, R., MOURÃO, M.P., MACEDO, V., GUERRA, J. Meningoencefalite chagásica: relato de um caso na Amazônia brasileira. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41, Encontro de Medicina Tropical do Cone Florianópolis/SC, 2005, Florianópolis, **Resumos**, Florianópolis: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2005, Tema Livre, p. 495.
- LAINSON, R., SHAW, J.J., FRAIHA NETO, H., MILES, M.A., DRAPER, C.C. Chagas's disease in the Amazon Basin. I. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, North Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **73**:193-204, 1979.
- LAINSON, R., SHAW, J.J., NAIFF, R.D. – Chagas' disease in the Amazon Basin: Speculation on transmission *per os*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **22**: 294-297. 1980.

- LALA, E.R., ANDÓ, MH, ZALLOUM L, BÉRTOLI M, DE OLIVEIRA MACHADO DALALIO M, SILVEIRA TG, GOMES ML, GUEDES TA, DE ARAÚJO SM. *Trypanosoma cruzi*. Different methods of data analysis to evaluate the genetics-biology relationship. **Experimental Parasitology**123(2):173-81, Epub 2009 Jul 5, 2009 Oct.
- LARANJA FS, DIAS E, NOBREGA G, MIRANDA A. Chagas disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation* 1956; 14(6):1035-1060.
- LENT, H. & WYGODZINSKI, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 163(1):-529, 1979.
- LENZI, H. L. The recent discovery of what might be a primordial escape mechanism for *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 79:273-292, 1984.
- LISBOA, C.V., MANGIA R.H, RUBIÃO. E., DE LIMA, N.R., DAS CHAGAS XAVIER, S.C., PICINATTI, A., FERREIRA, L.F., FERNANDES, O., JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**. 90(1):97-106, 2004.
- LISBOA, C.V., MANGIA, R.H., LUZ, S.L., KLUCZKOVSKI, A.J.R., FERREIRA, L.F., RIBEIRO, C.T., FERNANDES, O., JANSEN, A.M. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. **Parasitology** 133:603-11, 2006.
- LISBOA, C.V., PINHO, A.P., HERRERA, H.M., GERHARDT, M., CUPOLILLO, E., JANSEN A.M. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. **Veterinary Parasitology** 156(3-4):314-8, 2008.
- LIEWELLYN, M.S., MILES, M.A., CARRASCO, H.J., LEWIS, M.D., YEO, M., VARGAS, J., TORRICO., F, DIOSQUE., P, VALENTE, V.C., VALENTE, S.A., GAUNT, M.W. Genome-Scale Multilocus Microsatellite Typing of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Unit I Reveals Phylogeographic Structure and Specific Genotypes Linked to Human Infection. **PLoS Pathogens** 5(5): 1000410, 2009a.
- LIEWELLYN, M.S., LEWIS, M.D., ACOSTA, N., YEO, M., CARRASCO, H.J., SEGOVIA, M., VARGAS, J., TORRICO, F., MILES, M.A., GAUNT, M.W. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 1;3(9):e510, 2009b Sep.
- LOPES, J.D., CAULADA, Z., BARBIERE, C.L., CAMARGO, E.P. Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect Trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas' Disease. **American Journal of Tropical Medicine And Hygiene** 30(6):1183-1188, 1981.
- LUITGARDS-MOURA, J.F., VARGAS, A.B., ALMEIDA, C.E., MAGNO-ESPERANÇA, G., AGAPITO-SOUZA, R., FOLLY-RAMOS, E., COSTA, J., TSOURIS, P., ROSA-FREITAS, M.G. A. *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population from Roraima, Amazon region, Brazil,

has some bionomic characteristics of a potential Chagas disease vector. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 47(3): 131-137, 2005.

LUNA-MARÍN, K.P., JARAMILLO-LONDOÑO, C.L., HERNÁNDEZ-TORRES, J., GUTIÉRREZ-MARÍN, R., VALLEJO, G.A., ANGULO-SILVA, V.M. ITS-RFLP- and RAPD-based genetic variability of *Trypanosoma cruzi* I, human and vector strains in Santander, Colombia. **Parasitology Research** 105(2):519-28, Epub 2009 Apr 4.

LUQUETTI, A.O., MILES, M.A., RASSI, A., DE REZENDE, J.M., DE SOUZA, A.A., PÓVOA, M.M., RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi* zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene** 80(3):462-70, 1986.

MACARIO-REBELO, R.J.M., ALVES, G.A., LOROSA, E.S., PEREIRA, Y.N.O., SILVA, F.S., LOPES DE BARROS, V.L. Distribuição das espécies do gênero *Triatoma* Laporte, 1833 (Reduviidae, Triatominae) no Estado de Maranhão Brasil. **Entomologia y Vectores** (6) 91-109, 1999.

MACHADO, C. A. & AYALA, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 98: 7396-7401, 2001.

MAIA DA SILVA, F., JUNQUEIRA, A. C., CAMPANER, M., RODRIGUES, A. C., CRISANTE, G., RAMIREZ, L. E., CABALLERO, Z. C., MONTEIRO, F. A., COURA, J. R., ANEZ, N. AND TEIXEIRA, M. M. G. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Molecular Ecology** 16:3361-73, 2007.

MAIA DA SILVA, F., NAIFF, R., MARCILI, A., GORDO, M., DAFFONSECANETO, J., NAIFF, M., FRANCO, A., CAMPANER, M., VALENTE, V., VALENTE, S.A.S. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. **Acta Tropica** 107: 68 -173, 2008.

MALCOLM, J.R. Comparative abundances of neotropical small mammals by trap height. **Journal of Mammalogy**, 72:188-192, 1991.

MANOEL-CAETANO FDA, S. & SILVA A.E. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. **Cadernos de Saúde Pública** 23(10): 2263-74, 2007 Oct.

MANOEL-CAETANO FDA S., CARARETO, C.M., BORIM, A.A., MIYAZAKI, K., SILVA, A.E. kDNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* in blood and oesophageal mucosa from chronic chagasic patients. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene** 102(11):1102-7, 2008 Nov.

MANTILLA, J.C., ZAFRA, G.A., MACEDO, A.M., GONZÁLEZ, C.I. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. **Human Pathology** 41(4):610-3. 2010 Apr; Epub 2010 Feb 12.

- MARANHÃO. Governo do Estado. **Dados gerais do Maranhão**. São Luís, 2009. Disponível em: <<http://www.saoluis.ma.gov.br>> Acesso em: 11/04/2009.
- MARCILI, A., VALENTE, V.C., VALENTE, S.A.S., JUNQUEIRA, AC.V., MAIA DA SILVA, F., NAIFF, R.D., CAMPANER, M., COURA, J.R., CAMARGO, E.P., MILES, M.A., TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology** **39**:615–623. 2009a.
- MARCILI, A., LIMA, L., VALENTE, V.C., VALENTE, S.A., BATISTA, J.S., JUNQUEIRA, A.C., SOUZA, A.I., DA ROSA, JA, CAMPANER M, LEWIS MD, LLEWELLYN MS, MILES MA, TEIXEIRA MM. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases** (6):1265-74. 2009b Dec;9, Epub 2009b Jul 24.
- MARTINS LP, MARCILI A, CASTANHO RE, THEREZO AL, DE OLIVEIRA JC, SUZUKI RB, TEIXEIRA MM, DA ROSA J.A., SPERANÇA, M.A. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **79**(3):427-34, 2008 Sep.
- MASCARENHAS, B.M. Triatomíneos da Amazônia: ocorrência de Triatomíneos na área do reservatório da Hidrelétrica de Tucuruí, Pará, e observações sobre o ciclo evolutivo de *R. robustus*, Larrouse, 1927 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Acta Amazonica**, **16/17**:607-616, 1986.
- MASCARENHAS, B.M. Descrição dos estádios imaturos de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia**, **3**(2):183-194, 1987.
- MASCARENHAS, B.M. Triatomíneos da Amazônia: sobre o habitat e algumas considerações comportamentais de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) na Região do Médio Rio Negro, Amazonas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia**, **7**(2): 107-116, 1991.
- MASCARENHAS, B.M., GALLATI, U., GUIMARÃES, D.G., PIMENTEL, D., BRÍGIDA, M.S., GUIMARÃES, D.D. Diagnóstico ambiental rápido – **Inventário Faunístico**. [Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, 2001] 21p. Texto digitado.
- MAYER, H.F. Infección experimental com *T. cruzi* por la via digestiva. **Anais del Instituto de Meicina. Regional**, **5**(3): 43, 1961.
- MAZZA, S., SCHURMANN, K. Infección espontánea del quirquincho en Jujuy por el *Trypanosoma cruzi*. **6ª Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional del Norte**, 1930.
- MAZZA, S., ROMAÑA, C., SCHURMANN, K. Infección espontánea del armadillo del país por el *Trypanosoma cruzi*. Hallazgo de este flagelado en *Dasyus novencinctus* del Chaco santafezino. **Prensa Medica**. Argentina **17**: 1350, 1931.

- MAZZA, S., MONTANA, A., BENITEZ, C., JANZI, E. Transmission del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas. **MEPRA 28**: 41-46, 1936.
- MEJÍA-JARAMILLO, A.M., PEÑA, V.H., TRIANA-CHÁVEZ, O. *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. **Experimental Parasitology**; **121**(1):83-91. Epub 2008 Oct 8, 2009a, Jan.
- MEJÍA-JARAMILLO, A.M., ARBOLEDA-SÁNCHEZ, S., RODRÍGUEZ, I.B., CURA, C., SALAZAR, A., DEL MAZO, J., TRIANA-CHÁVEZ, O., SCHIJMAN, A.G. Geographical clustering of *Trypanosoma cruzi* I groups from Colombia revealed by low-stringency single specific primer-PCR of the intergenic regions of spliced-leader genes. **Parasitology Research**; **104**(2):399-410, Epub 2008 Oct 11, 2009b Jan.
- MENDONÇA, M.B.A., NEHME, N.S., SANTOS, S.S., CUPOLLILLO, E., VARGAS, N., JUNQUEIRA, A.C.V., NAIFF, R.D., BARRETT, T.V., COURA, J.R., ZINGALES, B., FERNANDES, O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA ciston. **Parasitology 124**, 177-184, 2002.
- MILES, M.A. A simple method of tracking mammals and locating triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* in Amazônian forest. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **25**: 671-674 1976.
- MILES, M.A., TOYE, P.J., OSWALD, S.C., GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene** **71**: 217-225, 1977.
- MILES, M.A., SOUZA, A.A., POVOA, M.M., SHAW, J.J., LAINSON, R., TOYÉ, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazônian Brazil. **Nature** **272**:819-821 1978.
- MILES, M.A., MARSDEN, P.D., PETTITT, L.E., DRAPER, C.C., WATSON, S., SEAH, S.K., HUTT, M.S., FOWLER, J.M. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rhesus monkeys 111. Electrocardiographic and histopathological findings. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene** **73**(5): 528-32, 1979.
- MILES, M.A., CEDILLOS, R.A., POVOA, M.M., DE SOUZA, A.A., PRATA, A., MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? **Lancet** **1**:1338-1340, 1981a.
- MILES, M.A., SOUZA, A.A., PÓVOA, M.M. Chagas' disease in the Amazon Basin. III. Ecotopes of ten triatomine species (Hemiptera, Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil. **Journal of Medical Entomology** **18**:266-278, 1981b.
- MILES, M.A. & SOUZA, A.A. Triatomíneos. In: **Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Belém, Fundação Serviços de Saúde Pública, 321-333, 1986.

- MILES, M.A. Culturing and biological cloning of *Trypanosoma cruzi*. In: Hyde, J.E. ed. Methods in molecular biology, protocols in molecular parasitology. **Totowa, Humana** 15-28, 1993.
- MILES, M.A., FELICIANGELI, M.D., DE. ARIAS, A.R. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **British Medical Journal**, **326**:1444-8. 2003.
- MILES, M.A., LLEWELLYN, M.S., LEWIS, M.D., YEO, M., BALEELA, M.R., FITZPATRICK, S., GAUNT, M.W., MAURICIO, I.L. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. **Parasitology** **136**:1509-1528, 2009.
- MILES, M.A. Orally acquired Chagas disease: lessons from an urban school outbreak. **J Infect Dis** **1**;201(9):1282-4, 2010 May.
- MINOLI, S.A. & LAZZARI, C.R. Take-off activity and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. **Acta Tropica** **97**:324-330, 2006.
- MONCAYO, A. Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. **World Health Statistics Quarterly** **50**:195-198, 1997.
- MONCAYO, A. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98**(5): 577-591, 2003.
- MONCAYO, A., SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **104** (Suppl1):17-30, 2009 Jul.
- MONROY, C., RODAS, A., MEJIA, M., ROSALES, R., TABARU Y. Epidemiology of Chagas disease in Guatemala: infection rate of *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nitida* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98**:305-10.2003.
- MONTEIRO, P.S. **Dinâmica de transmissão de protozoários cinetoplastida para a população humana de Paço do Lumiar, MA: descrição de rede trófica associada com a transmissão de *Trypanosoma cruzi***. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Brasília, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2000. 101p.
- MONTEIRO, F.A., WESSON, D.M., DOTSON, E.M., SCHOFIELD, C.J., BEARD, C.B. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene** **62**(4):460-5, 2000.
- MONTEIRO, F.A., ESCALANTE, A.A., BEARD, C.B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **Trends in Parasitology** **17**(7):344-7, 2001.

- MONTEIRO, F.A., BARRETT, T.V., FITZPATRICK, S., CORDON-ROSALES, C., FELICIANGELI, D., BEARD, C.B. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Molecular Ecology** 12(4): 997-1006, 2003.
- MONTEIRO, W.M., MAGALHÃES, L.K., SANTANA FILHO, F.S., BORBOREMA, M., SILVEIRA, H., BARBOSA, M.D. *Trypanosoma cruzi* TcIII / Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. **Tropical Medicine & International Health** Jun 23, 2010. [Epub ahead of print].
- MONTEIRO R.V., DIETZ J.M., JANSEN A.M. The impact of concomitant infections by *Trypanosoma cruzi* and intestinal helminths on the health of wild golden and golden-headed lion tamarins. **Research in Veterinary Science** 89(1):27-35, 2010 Aug.
- NAIFF, R. D., BARRETT, T. V., ARIAS, J. A. *Trypanosoma cruzi* nas glândulas anais de *Didelphis marsupialis*: primeiro registro de infecções naturais. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, 10, 1987. Salvador, **Resumos**, Salvador: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1987. p. 234-235.
- NAIFF, M.F., NAIFF, R.D., BARRET, T.V. Vetores selváticos de doença de Chagas na área urbana de Manaus (AM): atividade de vôo nas estações secas e chuvosas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 31:103-105, 1998.
- NATAN-LARRIER, L. Infections à Trypanosomes at voies de penetrations des virus **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique** 14:537-542, 1921.
- NEIVA, A. Contribuição para o estudo dos hematofagos brasileiros e descrição de uma nova espécie de Triatoma. **Brasil-Médico** 25:461-462, 1911.
- NILSSON, M.A., ARNASON, U., SPENCER, P.B.S., JANKE, A. Marsupial relationships and a timeline for marsupial radiation in South Gondwana. **Gene** 340:189-196, 2004.
- NÓBREGA, A.A., GARCIA, M.H., TATTO, E., OBARA, M.T., COSTA, E., SOBEL, J., ARAUJO, W.N. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. **The Emerging Infection Diseases** 15: 653-655, 2009.
- NOIREAU, F., VARGAS, F., BOSSENO, M.F., BRENIÈRE, S.F. Apparent trend to domesticity observed in *Panstrongylus rufotuberculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia. **Research and Reviews in Parasitology** 54:249-250, 1994.
- NOIREAU, F., BOSSENO, M.F., CARRASCO, R., TELLERIA, J., VARGAS, F., CAMACHO, C., YAKSIC, N., BRENIÈRE, F. Sylvatic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia. Trends towards domesticity and possible infection with *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal of Medical Entomology** 32: 594-598, 1995.
- NOIREAU, F., FLORES, R. & VARGAS, F. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 93:13-14, 1999.

- NOIREAU F, FLORES R, GUTIERREZ T, ABAD-FRANCH F, FLORES E, VARGAS F. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 94(1):23-7, 2000.
- NOIREAU, F. & DUJARDIN J-P. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 96:385-389, 2001.
- NOIREAU, F., CARBAJAL-DE-LA-FUENTE, A.L., LOPES, C.M., DIOTAIUTI, L. Some considerations about the ecology of Triatominae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 77(3):431-6, 2005.
- OCAÑA-MAYORGA, S., LLEWELLYN, M.S., COSTALES, J.A., MILES, M.A., GRIJALVA, M.J. Sex, Subdivision, and domestic Dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador **PLoS Neglected Tropical Diseases** 4(12): e915, 2010.
- O'CONNOR, O., BOSSENO, M.F., BARNABÉ, C., DOUZERY, E.J., BRENIERE, S.F. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases** 7(5):587-93, 2007.
- OLIVEIRA, I.A.S., SILVA, L.R., MÁRCIA FARIA, E., SILVA, M.F., FAGUNDES, A.C.G. Investigação entomológica e sorológica de animais silvestres e domésticos em áreas de surto da doença de Chagas aguda, no Município de Axixá do Tocantins, 2009, Tocantins - Brasil. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XLVII, 2011, Natal-RN. p1082, Multimídia.
- PANDOLFO, C. **Amazônia Brasileira. Ocupação, Desenvolvimento e Perspectivas Atuais e Futuras**. Belém, Cejup, 1994. 228p.
- PANTOJA, R.K.S., LEITE, M.A.O., PAUXIS, B.T., PINTO, A.Y.N., VALENTE, S.A.S., VALENTE, V.C. Relato de três casos autóctones de doença de Chagas aguda no Estado do Pará. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXXVI, 2000, São Luís-MA, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Luís-MA: 2000. 33: 386, TL 110.
- PARÁ. Governo do Estado. Secretaria Especial de Gestão. **Estatística Municipal**: Barcarena. Belém: SEPOF, 2006. Disponível em: <www.sepof.pa.gov.br/barcarena>. Acesso em 11/04/2008.
- PARÁ. Governo do Estado. Secretaria Especial de Gestão. **Estatística Municipal**: Belém. Belém: SEPOF, 2006. Disponível em: <www.sepof.pa.gov.br/barcarena>. Acesso em 11/04/2008.
- PARÁ. Governo do Estado. Secretaria Especial de Gestão. **Estatística Municipal**: Cachoeira do Arari. Belém: SEPOF, 2006. Disponível em: <www.sepof.pa.gov.br/barcarena>. Acesso em 11/04/2008.
- PEDROSO, A., CUPOLILLO, E., ZINGALES, B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. **Molecular and Biochemical Parasitology** 129(1):79-90, 2003.
- PEDROSO, A., CUPOLILLO, E., ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi: exploring the nuclear genome of zymodeme 3 stocks by chromosome size polymorphism. **Experimental Parasitology** 116(1):71-6, 2007 May.

- PENNINGTON, P.M., PAIZ, C., GRAJEDA, L.M., CORDÓN-ROSALES, C. Short report: concurrent detection of *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in domestic *Triatoma dimidiata* from Guatemala. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene** 80(2):239-41, 2009 Feb.
- PETERSON, N. E. & PINE, R. H. Chave para identificação de mamíferos da Região amazônica brasileira com exceção dos quirópteros e primatas. **Acta Amazônica** 12(2):465-482, 1982.
- PINHO, A.P., CUPOLILLO, E., MANGIA, R.H., FERNANDES, O., JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 94:509-14.2000.
- PINTO, A.Y.N., VALENTE, V.C., VALENTE, S.A.S., LIMA, J.A.N., ARAÚJO, J.E.A. Apresentação de um caso autóctone agudo de doença de Chagas em Cachoeira do Arari, Estado do Pará. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, XIII, 1993, Rio de Janeiro - RJ, **Programa e Resumos dos Temas Livres e Pôsters**, Rio de Janeiro – RJ: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1993, Temas Livres nº 45, p.108 – 108.
- PINTO, A.Y.N., HARADA, G., VALENTE, S.A.S., VALENTE, V.C., ARAÚJO, J.E.A., GOMES, F.S. Cardiopatia chagásica aguda em microepidemia familiar em Abaetetuba, PA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 31:82-83, 1999.
- PINTO, A.Y.N., HARADA, G.S., VALENTE, V.C., ABUD, J.E., GOMES, F.D., SOUZA, G.C., VALENTE, S.A.S. Cardiac attacks in patients with acute Chagas disease in a family micro-outbreak, in Abaetetuba, Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 34(5):413-419, 2001.
- PINTO, A.Y., VALENTE, S.A., VALENTE, V.C. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. **The Brazilian Journal of Infection Disease** 8(6):454-60, 2004.
- PINTO, C.M., OCAÑA-MAYORGA, S., LASCANO, M.S., GRIJALVA, M.J. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. **Journal Parasitology** 92(6):1251-5, 2006 Dec.
- PINTO, A.Y.N., VALENTE, S.A.S., VALENTE, V.C., FERREIRA JUNIOR, A.G., COURA, J.R. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 41:602-614, nov-dez, 2008.
- PINTO, A.Y.N., FERREIRA, A.G., VALENTE, V.C., HARADA, G.S., VALENTE S.A.S. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Revista Panamericana de Salud Publica** 25(1):77–83, 2009.
- PINTO, A.Y.N., FERREIRA, S.M.A.G., VALENTE S.A.S., VALENTE, V.C., GOMES, A.Jr. Alterações eletrocardiográficas durante e após tratamento com benzonidazol em fase aguda de doença de

Chagas autóctone da Amazônia brasileira. **Revista Panamericana de Salud Publica** [periódico na Internet]. 2010 Jun [citado 2011 Mar 31]1(2): 67-76. Disponível em: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232010000200008&lng=pt.

PÓVOA, M.M., SOUZA, A.A., NAIFF, R.D., ARIAS, J.R., NAIFF, M.F., BIANCARDI, C.B., MILES, M.A. Chagas' disease in the Amazon Basin IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the States of Amazonas and Rondonia, Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 78(5): 479-487, 1984.

PROMED NEWS. **Microepidemia escolar de Chagas agudo en Caracas**, Venezuela, 2007. Disponível em: <http://pro-med.blogspot.com/2007/12/proesp-enf-de-chagas-va-oral-brote_19.html>. Acesso em: 13/12/2007.

RAMÍREZ, J.D., GUHL, F., UMEZAWA, E.S., MORILLO, C.A., ROSAS, F., MARIN-NETO, J.A., RESTREPO, S. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. **Journal Clinical Microbiology** 47(12):3945-51, 2009 Dec.

RICKMANN, C. Epizootology of *Trypanosoma cruzi* in southwestern North American. **Journal Entomology of Honolulu**. 2(1): 87, 1966.

RODRIGUES, E. **Município de Santana**. Governo do Estado do Amapá, 2004. Disponível em: <http://www4.ap.gov.br/Portal_Gea/municipios/municipio-santana.htm> Acesso em: 16/06/2009.

RODRIGUES, B.A. & MELO, G.B. Contribuição ao estudo da tripanosomíase americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 37(1): 77-90, 1942.

RODRIGUES, I.R.C., SOUZA, A.A., VALENTE, S.A.S. Novo caso autóctone de doença de Chagas no Estado do Pará. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, XI, 1985, **Resumos**, Fortaleza: 1985.

RODRIGUES, I.C.R., SOUZA, A.A.A., TERCEROS, R., VALENTE, S.A.S. Doença de Chagas na Amazônia: I. Registro de oito casos autóctones em Macapá, AP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 21(4):193-197, 1988.

RODRIGUEZ, B., MAYA, B., BLANCO, M., NICHOLLS, S., HERNÁNDEZ, C. A., GUALDRÓN, L. E. Estudio de un brote de carditis chagásica aguda en una población adulta. **Acta Médica Colombiana** 17(Sup.1):280, 1992.

ROELLIG, D.M., ELLIS, A.E., YABSLEY, M.J. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory. **Journal Parasitology** 95(2):360-4, 2009.

ROJAS, A., VINHAES, M., RODRIGUEZ, M., MONROY, J., PERSAUD, N., AZNAR, C., NAQUIRA, C., HIWAT, H., BENITEZ, J. International Meeting on Surveillance and Prevention of the Chagas Disease in the Amazonia: implementation of the Inter-government Initiative Surveillance and

Prevention of the Chagas Disease in the Amazonia. Manaus, State of Amazon, Brazil, 19–22 September 2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 38: 82–89, 2005.

RUÍZ-SÁNCHEZ, R., LEÓN, M.P., MATTA, V., REYES, P.A., LÓPEZ, R., JAY, D., MONTEÓN, V.M. *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2005 May;100(3):281-3. Epub 2005 Aug 15.

ROMAÑA, C.A., PIZARRO, J.C.N., RODAS, E., GUILBERT E. Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 93: 594-595, 1999.

ROMANHA, A.J., BRENER Z. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme pattern as an epidemiological tool. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1988 Nov;83 Suppl 1:383-6. Review.

ROQUE, A.L., XAVIER, S.C., DA ROCHA, M.G., DUARTE, A.C., D'ANDREA, P.S., JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene** 79(5):742-9, 2008 Nov.

SABINO, E.C., OTANI, M.M., VINELLI, E., DEL POZO, A., SANDS, A., VERCAUTEREN, G., KIRCHHOFF, L.V. Re: "WHO evaluation of the serologic assays for Chagas disease". **Transfusion** 50(11):2507-8, 2010 Jul.

SALAZAR, A., SCHIJMAN, A.G., TRIANA-CHÁVEZ, O. High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. **Acta Tropica** 100(1-2):110-8, 2006.

SAMUDIO, F., ORTEGA-BARRÍA, E., SALDAÑA, A., CALZADA J. Predominance of *Trypanosoma cruzi* I among Panamanian sylvatic isolates. **Acta Tropica** 101(2):178-81, 2007 Feb.

SANCHEZ-GUILLEN MDEL, C., LOPEZ-COLOMBO, A., ORDONEZ-TOQUERO, G., GOMEZ-ALBINO, I., RAMOS-JIMENEZ, J., TORRES-RASGADO, E., SALGADO-ROSAS, H., ROMERO-DIAZ, M., PULIDO-PEREZ, P. AND PEREZ-FUENTES, R. Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 101: 733–740, (2006).

SANTOS, S.S., CUPOLILLO, E., JUNQUEIRA, A., COURA, J.R., JANSEN, A., STURM, N.R., CAMPBELL DA, FERNANDES, O. The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 96(8):755-64, 2002.

SANTOS-MALLET, J.R., SILVA, C.S., GOMES, S.A., OLIVEIRA, D.L., SANTOS, C.L., SOUSA, D.M., PINHEIRO, N.L., JUNQUEIRA, A.C., GONÇALVES, T.C. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* sylvatic isolates from Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research** 103(5):1041-5, 2008.

- SCHIJMAN, A.G., BISIO, M., ORELLANA, L., SUED, M., DUFFY, T., MEJIA-JARAMILLO, A.M., CURA, C., AUTER, F., VERON, V., QVARNSTROM, Y., DEBORGGRAEVE, S., HIJAR, G., ZULANTAY, I., LUCERO, R.H., VELAZQUEZ, E., TELLEZ, T., SANCHEZ, LEON Z., GALVÃO, L., NOLDER, D., MONJE RUMI, M., LEVI, J.E., RAMIREZ, J.D., ZORRILLA, P., FLORES, M., JERICIC, M.I., CRISANTE, G., AÑEZ, N., DE CASTRO, A.M., GONZALEZ, C.I., ACOSTA VIANA, K., YACHELINI, P., TORRICO, F., ROBELLO, C., DIOSQUE, P., TRIANA CHAVEZ, O., AZNAR C, RUSSOMANDO, G., BÜSCHER, P., ASSAL, A., GUHL, F., SOSA ESTANI, S., DASILVA, A., BRITTO, C., LUQUETTI, A., LADZINS J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases** **11**;5(1):e931, Jan 2011.
- SCHOFIELD C.J. The biosystematics of Triatominae. In: **Biosystematics of Haematophagous Insects**. Oxford: Systematics Association/ Clarendon Press, special volume 37. M.W. Service, (ed.), 1988. P. 284-312.
- SCHOFIELD, C.J. **Triatominae, biology and control**. West Sussex, Eurocommunica, 1994.p.80.
- SCHOFIELD C. *Trypanosoma cruzi* the vector-parasite paradoxo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **95**(4):535-44. 2000.
- SCHOFIELD, C.J., DIOTAIUTI, L., DUJARDIN, J.P. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **94**(Suppl1):375-8. Review, 1999.
- SCHOFIELD C.J., JANNIN, J., SALVATELLA, R. The future of Chagas disease controlo **Trends in Parasitology** **22**(12):583-8, 2006.
- SERRANO, M.G., CAMARGO, E.P., TEIXEIRA, M.M.G. *Phytomonas*: Analysis of polymorphism and genetic relatedness between isolates from plants and phytophagous insects from different geographic regions by RAPD fingerprints and synapomorphic markers. **The Journal of eukaryotic microbiology** **46**(6):618-25, 1999a.
- SERRANO, M.G., NUNES, L.R., CAMPANER, M., BUCK, G.A., CAMARGO, E.P., TEIXEIRA, M.M.G. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. **Experimental Parasitology** **91**(3):268-79, 1999b.
- SERRANO, M.G., CAMPANER, M., BUCK, G.A., TEIXEIRA, M.M., CAMARGO, E.P. PCR amplification of the spliced leader gene for the diagnosis of trypanosomatid parasites of plants and insects in methanol-fixed smears. **FEMS Microbiol Letters** **176**(1):241-6, 1999c.
- SHAW, J.J., LAINSON, R., FRAIHA, H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **3**:153-157, São Paulo, 1969.
- SHERLOCK, I.S., GUITTON, N., MILES, M.A. *Rhodnius paraensis*, espécie nova do Estado do Pará, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Acta Amazonica** **7**(1): 71-74, 1977.

- SHIKANAI-YASUDA, M.A., BRISOLA, C.M., GUEDES, L.A., SIQUEIRA, G.S., BARONE, A.A., DIAS, J.C.P., AMATO-NETO, V., TOLEZANO, J.E., PERES, B.A., ARRUDA, J.R.E.A., LOPES, M.H., SHIROMA, M., CHAPADEIRO, E. Possible oral transmission of acute chagas disease in Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 33:351-357,1991.
- SILVA, L.O.S., VALENTE, V.C., VALENTE, S.A.S., GOMES, F.S.G., FREITAS, A., BARBOSA, C.C.S., FONSECA, J.M.C. Ciclo Evolutivo Experimental e Perfil Epidemiológico do *Rhodnius milesi* (Valente, et.al. 2000), Uma nova espécie de triatomíneo descrita no Estado do Pará – Relatório Preliminar. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41, Encontro de Medicina Tropical do Cone Florianópolis/SC, 2005, Florianópolis. **Resumos**, Florianópolis: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Tema Livre, p. 85-86, 2005.
- SILVA, N.N., CLAUSSEL, D.T., NÓLIBUS, H., MELLO, A.L., OSSANAI, J., RAPONE, T., SNELL, T. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 10:265-276,1968.
- SILVEIRA, A.C. Situação do controle da doença de Chagas nas Américas. **Cadernos de Saúde Pública** 16:35-42, 2000.
- SILVEIRA, A.C.S. **O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. História de uma iniciativa internacional: 1991/2001**. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Organização Pan-americana de Saúde, Coord. A.C. Silveira e cols. P. 15-43, 2002.
- SILVEIRA, F.T., DIAS, M.G., PARDAL, P., LOBÃO, A.O., MELO, G.B. 1974 Nono caso autóctone de doença de Chagas registrado no estado do Pará, Brasil (Nota prévia). **Hiléia Médica** 1(1):61-62, Belém, 1979.
- SONTWOOD, T.R.E. **Ecological Methods with particular references to the study of insect populations**. 2ed. London, Chapman & Hall, 1978. 524 p.
- SOUTO, R., FERNANDES, O., MACEDO, A.M., CAMPBELL, D., ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 83: 141-152, 1996.
- SOUZA, R.D.E.C., BARBOSA, S.E., SONODA, I.V., AZEREDO, B.V., ROMANHA, A.J., DIOTAIUTI, L. Population dynamics of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) in Itanhomi, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 103(1):14-20, 2008.
- SOUZA, A.A.A., PARDAL, P.P.O., VALENTE, S.A.S., BOULHOSA, C.F., LIMA, J.A.N., CORREA, Z.J.C. Doença de Chagas no Estado do Pará: aspectos clínicos e laboratoriais de 4 novos casos autóctones. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, 9, 1989, Rio de Janeiro, RJ. **Resumos**, Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Tema Livre, p.10, 1989.
- STAL, C. Monographie der Gattung Conorhinus und Verwandten. **Berliner Entomology Zeitschr** 3:99-117, pl. 6, figs. I-IV, 1859.

- STEINDEL, M., TOMA, H.K., ISHIDA, M.M., MURTA, S.M.D.E., CARVALHO PINTO, C.J., GRISARD, E.C., SCHLEMPER, B.R.JR., RIBEIRO-RODRIGUES, R., ROMANHA, A.J. Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the state of Santa Catarina, Southern Brazil. **Acta Tropica** **60**(3):167-77, 1995.
- STEINDEL, M., KRAMER, PACHECO, L., SCHOLL, D., SOARES, M.D.E., MORAES, M.H., EGER, I., KOSMANN, C., SINCERO, T.C., STOCO, P.H., MURTA, S.M.D.E.; CARVALHO-PINTO, C.J., GRISARD, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** **60**(1):25-32, 2008.
- STORINO, R., JÖRG, M.E. Vias de infeccion y aspectos clinicos. *In*: Storini R. Milei (eds.) **Enfermedad de Chagas**. Doyma, Argentina, 1994.
- STURM, N.R., MURTHY, V.K., GARSIDE, L., CAMPBELL, D.A. The mini-exon gene of *Trypanosoma* (Nannomonas) *simiae*: sequence variation between isolates and a distinguishing molecular marker. **Acta Tropica** **71**(2):199-206, 1998.
- STURM, N. R., VARGAS, N. S., WESTENBERGER, S. J., ZINGALES, B., CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Parasitology** **33**:269-279. 2003.
- TÁLICE, R. Enfermedades parasitarias del hombre. **Montevideu** (1):174, 1964.
- TEIXEIRA, M.M., SERRANO, M.G., NUNES, L.R., CAMPANER, M., BUCK, G.A., CAMARGO, E.P. Trypanosomatidae: a spliced-leader-derived probe specific for the genus Phytomonas. **Experimental Parasitology** **84**(3):311-9, 1996.
- TEIXEIRA, A.R.L., MONTEIRO, P.S., REBELO, J.M., ARGANARAZ, E.R., VIEIRA, D., LAURIA-PIRES, L., NASCIMENTO, R., VEXENAT, C.A., SILVA, A.R., AULT, S.K., COSTA, J.M. Emerging Chagas Disease: Trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. **The Emerging Infections Diseases** **7**(1):100-112, 2001.
- TEIXEIRA, A.R., NASCIMENTO, R.J., STURM, N.R. Evolution and pathology in Chagas disease - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **101**(5):463-91, 2006a.
- TEIXEIRA, A.R., NITZ, N., GUIMARO, M.C., GOMES, C., SANTOS-BUCH, C.A. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal** **82**(974):788-98, 2006b.
- TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Advances in Parasitology** **36**:47-115, 1995.
- TIBAYRENC, M.L.E., PONT, F. Étude isoenzymatique d'isolats boliviens de *Trypanosoma cruzi* pratiqués chez *Rhodnius pictipes*. Données préliminaires sur la transmission de la maladie de Chagas dans l'Alto Beni bolivien. **Cahier ORSTOM, série Entomologie Médicale et Parasitologie** **22**:55-57, 1984.

- TOMA, H.K., YAMADA-OGATTA, S.F., BRANDÃO, A., KRIEGER, M.A., GOLDENBERG, S., FERNANDES, O. *Trypanosoma cruzi*: subtractive hybridization as a molecular strategy to generate new targets to distinguish groups and hybrids. **Experimental Parasitology** 117(2):178-87, 2007.
- TOMASINI, N., LAUTHIER, J.J., MONJE RUMI, M.M., RAGONE, P.G., ALBERTI D'AMATO, A.A., PÉREZ BRANDAN, C., CURA, C.I., SCHIJMAN, A.G., BARNABÉ, C., TIBAYRENC, M., BASOMBRÍO, M.A., FALLA, A., HERRERA, C., GUHL F., DIOSQUE. P. Interest and limitations of Spliced Leader Intergenic Region sequences for analyzing *Trypanosoma cruzi* I phylogenetic diversity in the Argentinean Chaco. *Infect Genet Evol.* 2011 Mar;11(2):300-7. Epub 2010 Nov 24
- TORRICO, F., ALONSO-VEGA, C., SUAREZ, E., RODRIGUEZ, P., TORRICO, M.C., DRAMAIX, M. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 70(2):201-9, 2004.
- TORRICO, F., ALONSO-VEJA, C., SUAREZ, E., RODRIGUEZ, P., TORRICO, M.C., DRAMAIX, M., TRUYENS, C., CARLIER, Y. Nivel de endemia de la infección por *T. cruzi* en lugar de residencia de la madre y desarrollo de la enfermedad de Chagas congênita em Bolívia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 38(Supl II):17-20, 2005.
- UMEZAWA, E.S., NASCIMENTO, M.S., KESPER-JUNIOR, N., COURA, J.R., BORGESPEREIRA, J., JUNQUEIRA, A.C.V., CAMARGO, M.E. Immunoblot assay using excreted/secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' Disease. **Journal of Clinical Microbiology** 34(9)2143-2147, 1996.
- UMEZAWA, E.S., LUQUETTI, A.O., LEVITUS, G., PONCE, C., PONCE, E., HENRÍQUEZ, D., REVOLLO, S., ESPINOZA, B., SOUSA, O., KHAN, B., SILVEIRA, J.F. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six latin american countries. **Journal of Clinical Microbiology** 1:449-452, 2004.
- UMEZAWA, E.S., SOUZA, A.I., PINEDO-CANCINO, V., MARCONDES, M., MARCILI, A., CAMARGO, L.M., CAMACHO, A.A., STOLF, A.M., TEIXEIRA, M.M. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica** 111(1):15-20, 2009.
- UNDP/WORLD BANK/OMS. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. **TDR News** 34, 1990.
- VALENCIA TELLERIA, A. **Investigación epidemiológica nacional de la enfermedad de Chagas**. La Paz, Ministério de Prevención Social y Salud Pública, 1990. 184p.
- VALENTE, S.A.S., LIMA, J.A.N., SOUZA, A.A.A., PÓVOA, M.M., RODRIGUES, I.R.C., MILES, M.A. *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) em Belém. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, X, 1987, Salvador-BA. **Programa e Resumos dos Temes Livres**, Salvador-BA: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1987, p. 85-86.

- VALENTE, S.A.S., SOUZA, A.A.A., MELO, P.R.R., LIMA, J.A.N., GOMES, F.S., CORREA, Z.J.C., MIRANDA, G.D. Considerações epidemiológicas sobre um novo caso autóctone de doença de Chagas observado no Estado do Pará. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXV, Florianópolis-SC, 1989. **Programa e Resumos dos Temas Livres e Posters**. p. 171, Temas Livres nº 149.
- VALENTE, S.A.S., COSTA, V.G., SOUZA, A.A.A., LIMA, J.A.N. Reservatórios e vetores silvestres de *T. cruzi* em Barcarena - PA. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXVIII, Belém - Pará, 1992. **Programa e Resumos dos Temas Livres e Posters**. p. 37, Temos Livres nº 82.
- VALENTE, S.A.S., CRESCENTE, J.A., VALENTE, V.C., ARAÚJO, J.E.A., LIMA, J.A.N. Observações sobre 5 casos agudos de doença de Chagas no Município de Afuá, Estado do Pará, 1992. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 26:81, 1993.
- VALENTE, S.A.S., DA SILVA, B.C., VALENTE, V.C., AQUINO, M.G. Epidemiologia do *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) e doença de Chagas em São Luís (MA). In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia, 1994, Goiânia - GO. **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia**. Programa e Resumos dos Temas Livres e Pôsters. p.218. 1995.
- VALENTE, S.A.S., VALENTE, V.C., NEVES, A.Y.P., RODRIGUES, C.A. 12 casos agudos e autóctones de doença de Chagas no Estado do Pará em 1996: a repercussão da implantação de um sistema de Vigilância na Amazônia Brasileira. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 33, 1997a, Belo Horizonte, **Resumos**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 016:36.
- VALENTE, V.C., VALENTE, S.A.S., PEREIRA, L.J.M. & ALENCAR, F.A. Megacólon chagásico no Estado do Pará: relato do 2º caso autóctone. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXXIII, 1997, Belo Horizonte-MG, **Programa e Resumos dos Temas Livres e Pôsters**, Belo Horizonte: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1997, Tema Livre 106, p. 74-74.
- VALENTE, S.A.S., VALENTE, V.C., CÉSAR, M.J.B., SANTOS, M.P. Registro de 15 casos autóctones de doença de Chagas no Estado do Amapá com evidências de transmissão oral. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 33, 1997, Belo Horizonte-MG, **Programa e Resumos dos Temas Livres e Pôsters**. Belo Horizonte: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1997, Tema Livre 056, p.53.
- VALENTE, S.A.S., VALENTE, V.C., FRAIHA NETO, H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94:395-398, 1999a.
- VALENTE, S.A.S., LEÃO, R.Q., VALENTE, V.C., PINTO, A.Y.N., CRESCENTE, J.A.B., PARDAL, P.P.O., VALE, T.J.L. Microepidemia familiar com 11 casos de doença de Chagas em Abaetetuba, Estado do Pará com suspeita de transmissão oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 31:83-84, 1999b.

- VALENTE, V.C., PINTO, A.Y.N., VALENTE, S.A.S. Novo episódio familiar com 7 casos de doença de Chagas aguda e autóctone em Bagre, Estado do Pará. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXXVI, 2000, São Luís-MA, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **33**:388-389. São Luís-MA: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Tema Livre 113.
- VALENTE, S.A.S., PIMENTEL, P.S., VALENTE, V.C., PINTO, A.Y. N., SOUZA, G.C.R., CARVALHO, L.S. Microepidemia familiar de doença de Chagas em Santarém, primeiro registro no Oeste do Pará.. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXXVII, Salvador, BA, 11 a 15/03/2001. AO 024, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **34**:19-20, 2001.
- VALENTE, V. C., VALENTE, S. A. S., PINTO, A. Y. N. Microepidemia com 10 casos de doença de Chagas em Ponta de Pedras Região do Marajó, Pará com suspeita de transmissão oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p.164, 2002. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,38, Foz do Iguaçu, PR, 24 a 28/02/2003.
- VALENTE, V. C., VALENTE, S. A. S., GOMES, F. S. G., ARAÚJO, J. E. A., SOUZA, G. C. Triatomíneos silvestres avançam sobre o domicílio do homem em Abaetetuba, Pará: relato de estudo preliminar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p.37, 2004. Suplemento 1. Apresentado no Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XL, 2004, Aracaju, 2004.
- VALENTE, S. A. S. & VALENTE, V. C. Microepidemia Familiar com Três Casos Agudos de Doença de Chagas em Belém Estado do Pará. In: XL CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL - I ENCONTRO DE MEDICINA TROPICAL DO CONE SUL, 2005, 2005, Florianópolis/SC.. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38. p. 413-413, 2005.
- VALENTE, S.A.S., VALENTE, V.C., PINTO, A.Y.N., MIRANDA, C., GOMES, F.S.G., ALMEIDA, R. Micro epidemia com 28 casos de doença de Chagas aguda (DCA) em Santana, Ap, com provável envolvimento do açaí como veículo de transmissão oral. **Revista de Patologia Tropical** **34**(Supl.1): 63, 2005.
- VALENTE, S. A. S., VALENTE, V. C., PINTO, A. Y. N. Epidemiologia e transmissão oral da Doença de Chagas na Amazônia Brasileira. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Unidad Regional de Prevention y Control de Enfermedades Transmisibles (DPC/CD/CHA), Grupo Técnico Especializado en inocuidad de Alimentos. Informe de la consulta técnica en Epidemiologia, Prevección y Manejo de la transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA), Rio de Janeiro, 46 p, 2006.
- VALENTE, S. A. S. **Estudos dos surtos de doenças de Chagas ocorridas no Pará e Amapá: análise parasitológica, sorológica e molecular.** Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Rio de Janeiro, RJ, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, 2008, 162p.
- VALENTE, S. A. S., VALENTE, V. C., PINTO, A. Y. N., CÉSAR, M.J.B., SANTOS, M.P., MIRANDA, C.O.S., CUERVO, P., FERNANDES, O., Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the

Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 103:291-297, 2009.

- VALENTE, V.C., VALENTE, S.A.S., PEREIRA, L.J.M., ALENCAR, F.A. Megacolon chagásico no Estado do Pará: relato do 2º caso autóctone. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXXIII, 1997, Belo Horizonte-MG. **Programa e Resumos dos Temas Livres e Pôsters**. Tema Livre 106, p. 74-74.
- VALENTE, V.C., TELES, A.P., VALENTE, S.A.S., PARDAL, P.P.O. Episódio familiar com 4 casos de doença de Chagas autóctone em Santana, Estado do Amapá. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 31:60, 1998.
- VALENTE, V.C., VALENTE, A.S.S., CARCAVALLO, R.U., ROCHA, D.S., GALVÃO, C., JURBERG, J. Considerações sobre uma nova espécie do gênero *Rhodnius* Stål, do Estado do Pará, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomologia y Vectores**, Rio de Janeiro, 8(1): 65-80, 2001.
- VALENTE, V.C., VALENTE, S.A.S., PINTO, A.Y.N. Microepidemia com 10 casos de doença de Chagas em Ponta de Pedras Região do Marajó, Pará com suspeita de transmissão oral. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXXVIII, 2003, Foz do Iguaçu-PR, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 35:164, 2002.
- VALENTE, V. C., VALENTE, S. A. S., NOIREAU, F., CARRASCO, H. J., MILES, M. A. Chagas Disease in the Amazon Basin: association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with domestic pigs. **Journal of Medical Entomology** 35: 99-103, 1998.
- VENTURA, R.M., PAIVA, F., SILVA, R.A.M.S., TAKEDA, G., BUCK, G.A., TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. **Experimental Parasitology** 99:37-48, 2001.
- VERGANI, F. Estudio sobre la vección de tripanosomas por medio de dípteros no vulnerantes. **Boletín del Instituto del Investigaciones Veterinarias** 4:657, 1952.
- VIANA, S., FARIAS, E., LIMA, F., BATISTA, L., VIEIRA, A., SILVA, L., LOBATO, C., NASCIMENTO, S., CHALUB, S. Doença de Chagas no Estado do Acre: registro de três casos de Miocardiopatia Chagásica Aguda autóctone no Município de Rio Branco, 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 27:177, 1994.
- VILLELA, M.M., SOUZA, J.M.B., MELO, V.P., DIAS, J.C.P. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas em programa descentralizado: avaliação de conhecimentos e práticas de agentes municipais em Região endêmica de Minas Gerais, Brasil (Chagas disease epidemiological surveillance in a decentralized program: evaluation of practice and knowledge among municipal health agents in an endemic region of Minas Gerais State, Brazil). **Cadernos de Saúde Pública** 23:2428-2438, 2007.

- VINAS-ALBAJAR, P., LAREDO, S.V., TERRAZAS, M.B., COURA, J.R. Dilated cardiomyopathy in patients with chronic chagasic infection: report of two fatal autochthonous cases from Rio Negro, State of Amazonas, Brazil **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36:401-7.2003.
- WESTENBERGER, S.J., BARNABE, C., CAMPBELL, D.A., STURM, N.R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics** 171(2):527-43, 2005.
- WESTENBERGER, S.J., CERQUEIRA, G.C., EL-SAYED, N.M., ZINGALES, B., CAMPBELL, D.A., STURM, N.R. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **BMC Genomics** 22,7:60, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. Geneva. (**WHO Technical Report Series**, 905, 105 p), 2002.
- XAVIER, S.S., SOUSA, A.S., VINAS, P.A., JUNQUEIRA, A.C., BOIA, M.N., COURA, J.R. [Chronic chagasic cardiopathy in the Rio Negro, Amazon State. Report of three new autochthonous cases confirmed by serology, clinical examination, chest X-rays, electro and echocardiography]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39(2):211-6, 2006.
- YEO, M., ACOSTA, N., LLEWELLYN, M., SANCHEZ, H., ADAMSON, S., MILES, G.A., LOPEZ, E., GONZALEZ, N., PATTERSON, J.S., GAUNT, M.W., D.E., ARIAS, A.R., MILES, M.A. rigns of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International Journal of Parasitology** 35(2):225-33, 2005.
- YOSHIDA N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 78(1):87-111. Epub 2006.
- YOSHIDA N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International** 57(2):105-9, 2008.
- ZICCARDI, M. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. The infection rates of trypanosomes in squirrel monkeys at two sites in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 92(4):465-70, 1997.
- ZICCARDI, M., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., LAINSON, R., BRÍGIDO, M.C., MUNIZ, J.A. Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 95(2):157-9, 2000 Mar-Apr.
- ZICCARDI M, DE OLIVEIRA RL, ALVES MC, DA CRUZ MDE F. *Trypanosoma saimirii* Rodhain, a junior synonym of *Trypanosoma rangeli* Tejera. **Journal Parasitology** 91(3):653-6, 2005 Jun.
- ZINGALES, B., SOUTO, R.P., MANGIA, R.H., LISBOA, C.V., CAMPBELL, D.A., COURA, J.R., JANSEN, A., FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **International Journal for Parasitology** 28:105-112, 1998.

- ZINGALES, B., STOLF, B.S., SOUTO, R.P., FERNANDES, O., BRIONES, M.R. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **94**:159-164, 1999.
- ZINGALES, B., ANDRADE, S.G., BRIONES, M.R., CAMPBELL, D.A., CHIARI, E., FERNANDES, O., GUHL, F, LAGES-SILVA, E., 2MACEDO, A.M., MACHADO, C.R., MILES, M.A, ROMANHA, A.J., STURM, N.R., TIBAYRENC, M., SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Second Satellite Meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **104**(7):1051-4, 2009 Nov.
- ZELEDÓN, R., UGALDE, J.A., PANIAGUA LA 2001. Entomological and ecological aspects of six sylvatic species of triatomines (Hemiptera, Reduviidae) from the collection of the National Biodiversity Institute of Costa Rica, Central America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **96**: 757-764, 2001.

9. ANEXOS

Anexo 1

Artigo publicado durante a execução desta tese.

International Journal for Parasitology 39 (2009) 615–623



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara



Trypanosoma cruzi in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission [☆]

Arlei Marcili ^a, Vera C. Valente ^b, Sebastião A. Valente ^b, Angela C.V. Junqueira ^c, Flávia Maia da Silva ^a, Ana Yecê das Neves Pinto ^b, Roberto D. Naiff ^d, Marta Campaner ^a, José R. Coura ^c, Erney P. Camargo ^a, Michael A. Miles ^e, Marta M.G. Teixeira ^{a,*}

^aDepartamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

^bLaboratório de Doença de Chagas, Instituto Evandro Chagas, Belem, PA, Brazil

^cLaboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^dInstituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brazil

^eDepartment of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK

Anexo 2

Artigo publicado durante a execução desta tese.

Infection, Genetics and Evolution 9 (2009) 1265–1274



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: New hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering[☆]

Arlei Marcili^a, Luciana Lima^a, Vera C. Valente^b, Sebastião A. Valente^b, Jael S. Batista^c, Angela C.V. Junqueira^d, Alda I. Souza^e, João A. da Rosa^f, Marta Campaner^a, Michael D. Lewis^g, Martin S. Llewellyn^g, Michael A. Miles^g, Marta M.G. Teixeira^{a,*}

^a Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 1374, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

^b Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil

^c Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brazil

^d Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Campo Grande, MS, Brazil

^f Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, Brazil

^g Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK

Anexo 3

Artigo publicado durante a execução desta tese.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (2009) 103, 291–297



ELSEVIER

available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevierhealth.com/journals/trst



Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites

Sebastião Aldo da Silva Valente^{a,*}, Vera da Costa Valente^a,
Ana Yecê das Neves Pinto^a, Maria de Jesus Barbosa César^b,
Marivaldo Picanço dos Santos^b, Clóvis Omar Sá Miranda^b,
Patrícia Cuervo^c, Octavio Fernandes^c

^a SVS – Instituto Evandro Chagas, Belém, PA, Brazil

^b Secretaria de Saúde do Estado do Amapá, Macapá, AP, Brazil

^c Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Received 14 May 2008; received in revised form 30 October 2008; accepted 31 October 2008
Available online 31 December 2008

Anexo 4

Artigo publicado durante a execução desta tese.

ARTIGO/ARTICLE

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41(6):602-614, nov-dez, 2008

**Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira.
Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão
observados entre 1988 e 2005**

Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region. Study
of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão
observed between 1988 and 2005

**Ana Yecê das Neves Pinto¹, Sebastião Aldo Valente¹, Vera da Costa Valente¹,
Alberto Gomes Ferreira Junior² e José Rodrigues Coura³**

Aprovação do CEPAN

ANEXO 5



Parecer de Aprovação Nº 0018/2008/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - Nº 002/2008

Ananindeua/PA, 12 de setembro de 2008.

Projeto: “Epidemiologia e caracterização molecular de isolados de *trypanosoma cruzi* do Pará, Amapá e Maranhão”.

Pesquisador Responsável: VERA DA COSTA VALENTE

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este CEPAN, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,

NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO

Coordenador do CEPAN/IEC

Anexo 6

Autorização do IBAMA

 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE E DA AMAZÔNIA LEGAL INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS 			
LICENÇA PARA CAPTURA / COLETA TRANSPORTE / EXPOSIÇÃO			
NUMERO LICENÇA 0017 / 1995	Nº REGISTRO NO IBAMA Centro de Referência em Pesquisa- 900035	PERÍODO DE VALIDADE 1995 a 30/12/2005	PROCESSO Nº 02018.002971/91-12.
OBJETO: <input checked="" type="checkbox"/> CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input type="checkbox"/> COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA) <input type="checkbox"/> TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA <input type="checkbox"/> EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES <input type="checkbox"/> MANUTENÇÃO DE ANIMAIS EM CATIVEIRO <input type="checkbox"/> OUTROS:		FAVORECIDO: <input type="checkbox"/> ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA <input checked="" type="checkbox"/> PESQUISADOR <input type="checkbox"/> EXPOSITOR/CONCURSO <input type="checkbox"/> CRIADOURO COMERCIAL <input type="checkbox"/> CRIADOURO CIENTÍFICO <input type="checkbox"/> OUTROS:	
FAVORECIDOS: NOME: Pesquisadores: Sebastião Aldo da Silva valente, Vera da costa Valente. INSTITUIÇÃO/ ENDEREÇO: Instituto Evandro Chagas – IEC/ MS - Av. Almirante Barroso Nº 492 – MARCO- BELÉM/PA – CEP: 66.090-000. RESPONSÁVEL PELA ATIVIDADE: Os favorecidos.			
TRANSPORTADOR: Os favorecidos. MEIO DE TRANSPORTE: Terrestre/ Fluvial/ Aéreo. PROCEDÊNCIA/LOCAL DE COLETA /CAPTURA: AREAS DE INFLUÊNCIA DO PROJETO. DESTINO: Instituto Evandro Chagas - VSV/MS.			
QUANTIDADE / TIPO Amostras de sangue, fezes, biópsias de pele, e alguns exemplares dos grupos solicitados	NOME CIENTÍFICO <i>Ordem marsupialia.</i> <i>Ordem Chiropteraa</i> <i>Ordem rodentia</i> <i>Ordem edentata</i> <i>Ordem carnívora</i> <i>Ordem primates</i> <i>Triatomíneos</i>	NOME COMUM Flor, fruto e ramas de flora Fauna silvestre endêmica da região do projeto.	
• OBSERVAÇÕES E CONDICIONANTES: 1. O uso desta licença é de caráter pessoal e intransferível. 2. O manejo de espécimes vivos para coleta do material biológico acima referido deve observar o cumprimento das demais regulamentações vigentes concernentes à atividade; 3. Ao término da validade desta licença, o responsável pela atividade deverá apresentar ao Ibama relatório de atividades e cópia das publicações resultantes dos trabalhos decorrentes do uso dos espécimes-objeto desta licença. Cabe ao Ibama e aos pesquisadores favorecidos o direito de tornar público os dados resultantes das atividades aqui licenciadas, respeitados os direitos de propriedade intelectual.			
LOCAL E DATA DE EMISSÃO Belém (PA), 30 de dezembro de 2005.		AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA E CARIMBU)  Maria do Carmo de O. Brígido IBAMA - SUPES/PA Matrícula 1336108	
			

ANEXO 7



Parecer de Aprovação nº 0012/2008
 Protocolo CEP/IEC - Nº 005/08
 CAAE: 0005.0.072.000-07

Ananindeua/PA, 23 de abril de 2008.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: “Epidemiologia e caracterização molecular de isolados de *Trypanosoma cruzi* do Pará, Amapá e Maranhão”.

Pesquisador Responsável: VERA DA COSTA VALENTE

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, em sua reunião ordinária realizada em 22/04/2008, cientificamos que o referido projeto de pesquisa foi considerado **aprovado**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.


 MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC

ANEXO 8

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Protocolo de Pesquisa:

TRYPANOSOMA CRUZI LINHAGEM TCI: EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO PARÁ, AMAPÁ E MARANHÃO.

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, (nome e profissão) residente e domiciliado na, RG , e inscrito no CPF/MF nascido(a) em ____ / ____ / ____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do projeto **TRYPANOSOMA CRUZI LINHAGEM TCI: EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO PARÁ, AMAPÁ E MARANHÃO.**

Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Objetivo geral

Realizar um estudo epidemiológico dos ciclos de transmissão da linhagem TCI de *T. cruzi*, utilizando métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na caracterização de isolados humanos, de triatomíneos e de reservatórios no Pará e Amapá (surto de doença de Chagas) e na Ilha de São Luís no Maranhão (ausências de casos humanos de DC).

1.5.2. Objetivos específicos

- Estudo epidemiológico dos surtos de doença de Chagas ocorrido nos municípios de Barcarena e Cachoeira do Arari (Pará) e Santana (Amapá) e tentativa de esclarecer o ciclo de transmissão;
- Avaliação epidemiológica do ciclo de transmissão de *T. cruzi* na ilha de São Luís, Maranhão;
- Avaliar a soro-prevalência para anticorpos anti- *T. cruzi* nas comunidades estudadas
- Analisar as formas clínicas apresentadas pelos pacientes;
- Isolar *T. cruzi* de pacientes (hemoculturas e/ou xenodiagnóstico);

- Genotipar os isolados e analisar a variabilidade genética entre os isolados de *T. cruzi*;
- Inferir relações filogenéticas entre os isolados obtidos e outros da Região Amazônica e de outras regiões.

Você está sendo convidado a participar deste estudo, pois faz parte de comunidades onde ocorreu ou tem indicadores epidemiológicos que possibilitam a ocorrência de casos agudos de doença de Chagas. Você está doando uma alíquota de seu sangue para que possamos realizar os testes de diagnósticos adequados como os exames parasitológicos e sorológicos.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se desenvolvam diagnósticos precoces para a doença de Chagas de fase aguda.
- II) Essa coleta de sangue será feita exclusivamente para este estudo e em nada influenciará a minha saúde; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo no momento da coleta para a coleta de sangue (introdução da agulha para retirada do sangue). Os riscos da retirada de sangue são eventualmente um pequeno hematoma local (rouxidão), algum desconforto e, raramente, tontura. Todo o material utilizado é estéril, atóxico e descartável. Nos casos positivos o material será guardado na soroteca do Instituto Evandro Chagas para futuros estudos.
- III) Foram coletados 10 ml de sangue. Posso ser reconvocato para novas doações, caso necessário.
- IV) Quando detectado um caso agudo de doença de Chagas receberei todo o tratamento específico e acompanhamento da doença gratuitamente.
- V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico.
- VII) Os resultados obtidos durante este trabalho foram mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.
- VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.
 Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Este estudo visa um maior conhecimento sobre a doença de Chagas na Região visando elaborar estratégias mais eficientes de controle. É provável que o voluntário em questão não seja beneficiário direto destes avanços.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Evandro Chagas na Coordenação do Dr. Manoel do Carmo Pereira Soares, Instituto Evandro Chagas. Rodovia BR 316, Km7 s/n. Bairro Levilândia, Ananindeua, PA. CEP 67.030-070. Fone 91-3214-22237.

Quaisquer dúvidas, que possam ocorrer com relação a esse estudo, poderão ser contatados:

Dr. Vera da Costa Valente – Laboratório de Doença de Chagas – Instituto Evandro Chagas. Rodovia BR 316, Km7 s/n. Bairro Levilândia, Ananindeua, PA. CEP 67.030-070. Fone 91-3214-2107.

Belém, ____ de _____ de 200__.

() Voluntário

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Coordenador: _____



ANEXO 9

Ficha Epidemiológica

	SEPAR - LABORATÓRIO DE DOENÇA DE CHAGAS FICHA EPIDEMIOLÓGICA
---	---

M.: _____ N°/CAMPO: _____

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: _____ Data: ____/____/____

Naturalidade: _____ Profissão: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Procedência da requisição: _____

Instituição: _____ Médico: _____ Telefone: _____

Residências anteriores: _____

Período: _____ Município/Cidade-Estado: _____

Material a examinar:

Sangue Soro LCR Tecido Outros

Exame a realizar:

Resultado: _____ Data: ____/____/____

Sorologia:

Hemocultura

Xenodiagnóstico

Exame a fresco

Exame após coloração

Histórico Clínico

Febre 37 - 38,5°C Sinal de Romaña Náuseas

Astenia Chagoma de inoculação Dores musculares

Edema generalizado Enfartamento ganglionar Miocardia aguda

Hepato-esplenomegalia

Já fez algum exame para doença de Chagas? Sim Não Qual? _____

Histórico epidemiológico

Possui antecedentes / chagásicos? Sim Não Quais? Pai Mãe Outros

Já recebeu sangue? Sim Não Quantas vezes? _____ Em que período? _____

Já doou sangue? Sim Não Quantas vezes? _____ Em que período? _____

Reside ou residiu em que tipo de casa? Madeira Barro Alvenaria

Coberta com palha Telha Cavaco

Conhece "barbeiros"? Sim Não

Já encontrou alguma vez dentro ou próximo de casa? Sim Não

Já foi picado por "barbeiro"? Sim Não Quantas vezes? _____

Há quanto tempo? _____

Próximo da residência existe algum tipo de mata? Sim Não

Palmeiras Mata fechada Serrado Outros

Costuma(va) acampar com frequência ou morou(va) em fazendas? Sim Não

Come(u) carne de caça com frequência? Sim Não Poucas vezes

Tatú Mucura Cotia Paca Macaco Veado Aves

Observações:

ANEXO 10

Meio bifásico – (DIFCO)

O meio ágar-sangue bifásico foi predominantemente usado no isolamento primário e cultivo de estoques, e apresentava a seguinte composição:

Difco bacto ágar-sangue base, 14g.

BBL tripticase peptona, 5g.

Oxoid L 28 ágar purificado, 3g.

Cloreto de sódio (ANALAR), 6g.

Água destilada, 1.000 ml.

Sangue inativado de coelho, 0,5 ml por tubo.

Visando evitar a contaminação de culturas para isolamento primário de *T. cruzi* durante os trabalhos de campo, foram utilizados tubos de sistema a vácuo (BDH), a inoculação sendo feita através da tampa, conforme preconizado por MILES (1993).

Meio monofásico – RPMI 1640 (GIBCO)

Este meio requer os seguintes componentes: RPMI 1640 (Gibco, BRL, Paisley, Scotland) suplementado com 0,5% (w/v) tripticase (BBL), 0,5% (w/v) HEPES, 0,03M hemin, 10% (v/v) SBF inativado, 2 mM de glutamato de sódio, 2 mM de piruvato de sódio e antibióticos. Preparadas como segue: solução de tripticase estéril concentrada 100X (0,175 g/ml autoclavada), HEPES (1M, esterilizada a filtro) e HEMIN (2,5 mg/ml em 0,01M NaOH, autoclavado). Adicionar 2,8 ml de tripticase, 2 ml de HEPES e 0,8 ml para cada 100 ml de solução estoque de RPMI 1640, junto com 10 ml de SBF, 1 ml de 200 mM de glutamato de sódio, 200 mM de piruvato de sódio (com penicilina, estreptomicina, concentração final 250 UI/ml e 250 µg/ml, respectivamente). As soluções de glutamina, piruvato e antibióticos é esterilizada em filtro, antes da adição. Para acondicionar os meios, foram utilizados frascos plásticos de 50 ml, descartáveis (Falcon, USA). A adição de 5-fluorocytosine (100 µg/ml) e gentamicina (100 µg/ml) foi utilizada para evitar o crescimento de fungos e bactérias (MILES, 1993).

Meio monofásico de LIT Liver Infusion Tryptose

Solução 1: Infuso de Fígado

Liver infusion broth (LIB) marca DIFCO. Preparar solução a 10% em água bidestilada e autoclavar a 120°C por 20 minutos. Aliquotar e estocar a 4°C.

SOLUÇÃO 2: 4X SAIS

Preparar solução de hemina:

Adicionar 5 ml de água bidestilada em um tubo plástico de 50 ml. Adicionar 5 ml de trietanolamina (Sigma 1377). Homogenizar a solução com pipeta, observando a total retirada da trietanolamina. Adicionar 250 mg de hemina (Sigma H2250). Agitar em vortex até a completa dissolução (pode levar algum tempo).

Preparar em um copo de Becker:

	Aprox. 2 litros
NaCl	40g
KCl	4g
Na ₂ HPO ₄ anidro	80g
Triptose	50g
Solução hemina solubilizada	10 ml

Podendo aquecer a água para a dissolução ($\pm 30^{\circ}\text{C}$), acrescentar os sais um a um e agitar até a completa dissolução. Adicionar a solução de hemina ainda em agitação. Acertar o pH para 7.4 com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio. Evitar a utilização de ácido clorídrico.

Completar o volume para 2,5 litros (fazê-lo em proveta graduada) e agitar até a homogeneização. Aliquotar em garrafas de 500 ml e autoclavar a 120°C por 20 minutos.

SOLUÇÃO 3: GLUCOSE 40%

Preparar solução de glucose a 40% em água bidestilada e autoclavar a 120°C por 20 minutos. Estocar a 4°C

PREPARO DO LIT:

Solução 1	25 ml
Solução 2	125 ml
Solução 3	5 ml
Soro bovino fetal estéril	50 ml
Água bidestilada estéril	Completar p/ 500 ml

Antibióticos:

Penicilina	100 unidades/ml
Estreptomicina	100 $\mu\text{g/ml}$
Gentamicina	10 mg/l

ATENÇÃO: Não adicionar Fungizona ou Nistatina.

ANEXO 11

Descrição da técnica de hemaglutinação

Este método utiliza hemácias de aves estabilizadas e sensibilizadas com antígenos totais de *Trypanosoma cruzi* (antígenos solúveis), que são aglutinadas quando colocadas em contato com diluições de soros de pacientes chagásicos.

Amostra: Soro obtido a partir de punção venosa ou de coleta digital em tubos capilares. Não utilizar plasma, nem amostras contaminadas, turvas ou hemolisadas.

Procedimentos

A - Teste Qualitativo - Para triagem de amostras:

Usar uma cavidade por amostra, incluindo os controles positivo e negativo, a cada série de testes.

- 1) Em tubos de ensaio, diluir a 1/40 as amostras a ensaiar e os soros controle (R3 e R4) em diluente de soros R2A; Ex.: 10 µl da amostra + 0,4ml de R2A;
- 2) Transferir 50 µl da diluição de cada amostra e dos soros controle R3 e R4 para as cavidades respectivas da microplaca;
- 3) Homogeneizar bem a suspensão de hemácias (R1), por agitação delicada do frasco, e adicionar 25 µl a cada cavidade;
- 4) Para perfeita homogeneização, imprimir à placa vibração mecânica, batendo com os dedos nas bordas, seguidamente por 3 a 4 minutos. Deixá-la em repouso por 1 hora, à temperatura ambiente (cerca de 25°C, em local isento de vibrações);
- 5) Leitura - efetuada ao final da incubação.

Interpretação

REAÇÃO POSITIVA: Véu uniforme de hemácias recobrimdo toda a cavidade, podendo estar, às vezes, parcialmente retraído nas bordas.

REAÇÃO FRACAMENTE POSITIVA: Véu pouco nítido, apresentando pequeno depósito de hemácias no fundo da cavidade.

REAÇÃO NEGATIVA: Botão compacto de hemácias no fundo da cavidade.

Obs.: O título do soro positivo (R3) deverá ser confirmado por ensaio quantitativo, conforme descrito no esquema geral do teste quantitativo.

Em algumas populações, com certa frequência os soros apresentam aglutininas naturais da classe IgM que podem causar aglutinação inespecífica. A adição de 2-mercaptoetanol (2ME) às diluições de soros aqui indicadas, inativa anticorpos IgM e afasta essa interferência.

ANEXO 12

TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DOENÇA DE CHAGAS

Procedimento:

1. Separar as lâminas já fixadas com antígeno de *T. cruzi*, secar em estufa a 37°C, por 5 minutos, dentro de uma câmara úmida. Marcar as amostras com os números dos soros respectivos, em cada fileira de orifícios da lâmina.
2. Preparo das diluições em PBS: no primeiro orifício da placa colocar 200 µl de PBS; nos demais, 100 µl. Retirar do primeiro orifício 20 µl de PBS e desprezar. Em seguida, colocar 20 µl do soro a ser testado no primeiro orifício e agitar bem, usando a micropipeta.
3. Retirar 100 µl da primeira diluição e colocar no orifício seguinte, agitar e retirar 100 µl e assim proceder, sucessivamente, nos orifícios restantes. Deixar os 100 µl no último orifício. Colocar 20 µl de PBS nas lâminas onde está fixado o antígeno e deixar em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente. Retirar o PBS com a pipeta e substituir pelas diluições nos orifícios. Geralmente se usam as seguintes diluições: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280. Em seguida, levar as lâminas úmidas à estufa a 37°C, onde devem permanecer por 30 minutos.
4. Retirá-las, em seguida, lavá-las com jatos suaves de PBS e imergi-las nesse mesmo tampão por 10 minutos. Retirar e lavar com jatos suaves de água destilada, e imergi-las em água destilada, por mais cinco minutos.
5. Retirar as lâminas da água destilada, secá-las e colocar 10 µl do conjugado preparado com anti-IgG ou anti-IgM e Azul de Evans. Levar em câmara úmida para estufa a 37°C, durante 30 minutos.
6. Retirar as lâminas da estufa, lavar com jatos de PBS e imergi-las em PBS por 10 minutos. Secar as lâminas, montar com glicerina e observar em microscópio apropriado para imunofluorescência.

ANEXO 13

Soluções utilizadas na desinfecção das fezes de triatomíneos, antes da semeadura em meios de cultura:

- **Solução de Hibitane® (ICI):**

Gluconato de clorohexedine a 5%, um sachê de 10 ml diluído em 1 litro de água destilada.

- **Solução Mista:**

Composta de **Solução 1** (bicloreto de mercúrio - HgCl_2 0,025 g, cloreto de sódio - NaCl 0,65 g, HCl concentrado 0,125 ml, etanol absoluto 25 ml e água destilada 75 ml) e **Solução 2** (antibióticos: penicilina 5.000.000 UI, gentamicina 40 mg/ml; e fungicida: 5-fluorocitosina 1mg/ml, diluída em água destilada e protegida da ação da luz).